



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

IMPORTANCIA DE LOS SITIOS DE
FOSFORILACION DE LOS RECEPTORES α_{1A} Y
 α_{1B} ADRENERGICOS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
ALEJANDRO CABRERA WROOMAN

Tutor: DR. JESUS ADOLFO GARCIA SAINZ



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz, en el Departamento de Biología Celular en el Instituto de Fisiología Celular en la Universidad Nacional Autónoma de México, con financiamiento por parte de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM (IN212609) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (79908).

Alejandro Cabrera Wrooman fue alumno del Programa de Ciencias Bioquímicas de la UNAM y fue apoyado con becas del posgrado del CONACYT.

DEDICATORIA

A mis papas por su apoyo incondicional, su confianza y por exigirme siempre más.

A mis hermanos Lupita, Abraham y Ricardo porque siempre creyeron en mí.

A mi cuñado Ricardo, mis sobrinos Pamela y Kevin, por los buenos momentos.

A Andrea e Iker

A Rosa por estar conmigo

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo García Sáinz, por aceptarme en su laboratorio. Por sus valiosas enseñanzas como tutor, científico y como persona. Por su tolerancia y paciencia.

A mi comité tutorial de maestría:

Agradezco a la Dra. Marina Macias por sus comentarios para el desarrollo del proyectos y por su compromiso con el posgrado.

A mi comité tutorial de doctorado:

A la Dra. Rosario Muñoz Clares por tomar tan en serio el papel de co-tutora y por la buena disposición de enseñar.

Al Dr. Rolando Hernández, por sus preguntas siempre tan acertadas.

A mi jurado de examen doctoral:

A la Dra. Marina Macias, al Dr. Rolando Hernández, al Dr. Ignacio Camacho, al Dr. Enrique Ortega y al Dr. Jorge Vázquez, por sus valiosos comentarios en la revisión de mi escrito.

A Brenda por su apoyo y por los buenos consejos durante años.

A los miembros del laboratorio:

A Lupita y Fermín por que siempre estuvieron para ayudarme.

A Tere por facilitarme la vida dándome buenos consejos para las técnicas. A Tzindy y Ekaterina. A Rocío por los chismes y los desayunos. A Christian, Erendida, Aliesha, Party, Jean, Estrellita, Aurelio y Marco por las buenas bromas y todos los buenos momentos que pasamos juntos, dentro y fuera del laboratorio.

RECONOCIMIENTOS

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis formado por:

Dr. J. Adolfo García Sáinz
Dra. Rosario Muñoz Clares
Dra. Marina Macias
Dr. Rolando Hernández

El jurado del examen doctoral estuvo constituido por:

Presidente: Dr. José Vázquez Ramos
Vocal: Dr. Enrique Ortega Soto
Secretario: Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz
Suplente: Dra. Marina Macias Silva
Suplente: Ignacio Camacho Arroyo

Agradezco la asesoría técnica de la Dra. María Teresa Romero Ávila y de la Dra. Rocío Alcántara Hernández

Agradezco al personal de las unidades de apoyo del Instituto de Fisiología Celular

Unidad de Microscopia Electrónica
Dra. Araceli Patrón Soberano
Biol. Gabriel Orozco Hoyuela

Unidad de Biología Molecular
Dra. Laura Ongay Larios
Biol. María Guadalupe Códiz Huerta
Biol. Dolores Minerva Mora Cabrera

Unidad de Cómputo
Ing Juan Manuel Barbosa Castillo
Ing Ivette Rosas Arciniega

Taller de mantenimiento
Ing Aurey Galván Lobato
Ing Manuel Ortínez Benavides

INDICE	6
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
ABREVIATURAS	10
1. INTRODUCCION	
1.1 Receptores acoplados a proteínas G	11
1.2 Proteínas G	12
1.3 Desensibilización	15
1.4 Receptores quiméricos	18
1.4 Adrenalina	19
1.5 Receptores adrenérgicos	20
2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	26
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	28
4. MATERIALES Y METODOS	29
4.1 Cultivo celular	29
4.2 Determinación de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$	30
4.3 Ensayo de unión a ligando (Binding)	30
4.4 Fosforilación de los receptores	31
4.5 Construcción de las proteínas de fusión	32
4.6 Estudios de microscopía confocal	34
5. RESULTADOS	
5.1 Señalización y desensibilización	36
5.2 Inmunoprecipitación de los receptores fosforilados	42
5.3 Señalización y desensibilización de los receptores unidos a la EGFP	50
5.4 Inmuprecipitación de los receptores unidos a la EGFP	52
5.5 Internalización	55
6. DISCUSION DE RESULTADOS	61

7. CONCLUSIONES	66
8. REFERENCIAS	68
9. ANEXO I	74

RESUMEN

Los receptores α_1 -adrenérgicos median algunas de las acciones centrales y periféricas de la adrenalina y la noradrenalina. Se han descrito tres subtipos de receptores adrenérgicos denominados: α_{1A} , α_{1B} y α_{1D} , los cuales están acoplados a la proteína $G_{q/11}$. Estos receptores son regulados de manera distinta por la proteína cinasa C. El objetivo de este trabajo fue analizar la importancia de los sitios de fosforilación del extremo carboxilo de los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos en la fosforilación, desensibilización e internalización mediada por la activación de la proteína cinasa C. Los receptores se expresaron en la línea celular de riñón de embrión humano HEK293. La noradrenalina incrementa la concentración de calcio intracelular; al preincubar con ésteres de forbol se observó una diferencia clara en la desensibilización entre los receptores α_{1A} y α_{1B} ; no obstante, no se encontró diferencia entre los receptores quiméricos en que se intercambiaron los extremos carboxilos. Sin embargo, el receptor α_{1A} truncado sin el extremo carboxilo sí mostró una diferencia notable en la desensibilización. También se evaluó la fosforilación de todos estos receptores, hallando que el receptor α_{1B} tuvo una fosforilación más intensa que el α_{1A} ; al intercambiar los extremos carboxilos la intensidad de la fosforilación también se intercambia pero al eliminar el extremo carboxilo del receptor α_{1A} éste se fosforila con alta intensidad. Ni el receptor α_{1A} ni el α_{1A} truncado y fusionados a la proteína verde fluorescente se internalizan al ser estimulados durante 5 min con noradrenalina o con ésteres de forbol. Los datos sugieren que el extremo carboxilo del receptor α_{1A} -adrenérgico no es esencial para la desensibilización ni para la internalización y que existen sitios de fosforilación que podrían estar localizados en la tercera asa intracelular.

ABSTRACT

α_1 - Adrenergic receptors mediate some of the central and peripheral actions of adrenaline and noradrenaline. There are 3 subtypes of adrenergic receptors known as α_{1A} -, α_{1B} - and α_{1D} , which are coupled to $G_{q/11}$ protein. These receptors are regulated by protein kinase C. The primary goal of this work was to study the role of α_{1A} and α_{1B} adrenergic receptors carboxyl termini, in phosphorylation, desensitization and internalization. Noradrenaline increased the concentration of intracellular calcium, but when previously incubated with phorbol esters, the various receptors showed differences in desensitization. Despite this, there was no difference between chimeric receptors in which the carboxyl terminus were exchanged. However the carboxyl terminus truncated form of α_{1A} receptors showed marked protein kinase C mediated desensitization. The phosphorylation status of these receptors was evaluated and we found that α_{1B} receptors showed stronger phosphorylation than α_{1A} receptors. The phosphorylation intensity was exchanged in quimeric receptors. Nevertheless when the carboxyl terminus was eliminated α_{1A} adrenoceptors were strongly phosphorylated. Green fluorescent protein fusions of α_{1A} adrenergic receptors and its truncated version were unable to internalize in response to noradrenaline and phorbol esters stimulation. Our results suggest that the carboxyl terminus of α_{1A} adrenoceptor was not essential for desensitization or internalization. The phosphorylation sites not only localized in the carboxyl tail, maybe there are in the intracellular third loop.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RECEPTORES DE SIETE ASAS TRANSMEMBRANALES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) son proteínas integrales de membrana que representan la familia más grande de proteínas de membrana en el genoma humano y son el blanco para muchos fármacos. Estudios recientes demuestran que existen cerca de 800 GPCRs, los cuales tienen una estructura común de 7 dominios hidrofóbicos transmembranales, con un extremo amino terminal extracelular y un extremo carboxilo terminal intracelular. Estos receptores tienen mayor similitud en los dominios transmembranales; por el contrario las estructuras con menos similitud son el extremo carboxilo y el amino (figura 1). El extremo amino es el que presenta mayores diferencias en la secuencia y número de aminoácidos (Kobilka, 2007) y estas diferencias ayudaron a clasificar a los GPCRs en 5 familias: receptores de rodopsina, adhesión, gusto, glutamato y de secretina (Fredriksson et al., 2003).

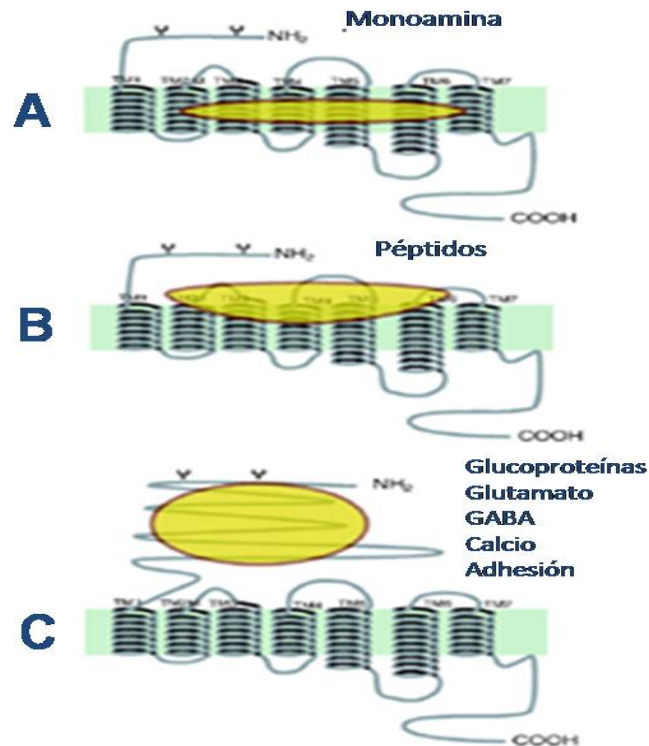


Figura 1. Esquema que describe la estructura secundaria y localización de los sitios de unión de los diferentes receptores acoplados a proteínas G. Modificada de (Kobilka, 2007).

Los GPCRs incluyen receptores para hormonas, neurotransmisores, otros agentes químicos, iones calcio, odorantes y para la luz. Estos receptores son comúnmente referidos como receptores acoplados a proteínas G, porque la mayoría de ellos activan su señal a través de proteínas G heterotriméricas (Pierce et al., 2002).

1.2 PROTEINAS G

Las proteínas G pertenecen a la superfamilia de proteínas con actividad de GTPasa; esta familia incluye dos grandes grupos de proteínas que participan en distintas vías de transducción:

- I) Las proteínas G de bajo peso molecular monoméricas tales como *Ras*, participan en las vías de transducción que conducen a la proliferación celular; *Rho* regula la arquitectura celular, modificando elementos del citoesqueleto de actina ante diversos estímulos extracelulares, y *Rab* participa en la movilización intracelular de vesículas.
- II) Las proteínas G heterotriméricas, compuestas por subunidades α , β y γ , las cuales sufren un cambio conformacional intercambiando GDP por GTP y que participan en la acción de receptores acoplados a proteínas G.

La subunidad α es responsable de la unión e hidrólisis del GTP, mientras que las subunidades β y γ están asociadas fuertemente formando un complejo (Gilman, 1987). Existen 16 genes $G\alpha$ en el genoma humano, los cuales codifican para 23 proteínas $G\alpha$. Estas proteínas están divididas en cuatro distintas subfamilias basadas en su similitud entre las secuencias, con un peso que varía entre los 39 y 45 kDa. Estas proteínas tienen diferentes funciones; la proteína $G\alpha_s$ activa a la adenilato ciclasa, mientras que la proteína $G\alpha_i$ inhibe la adenilato ciclasa, además de activar los canales de calcio. La proteína $G\alpha_q$ por su parte activa a la fosfolipasa C y la proteína $G\alpha_{12}$ está acoplada a la activación de Rho (Pierce et al., 2002).

El complejo $G\beta\gamma$ es un heterodímero funcional que forma una unidad estructural estable. Se conocen 5 genes humanos para la subunidad $G\beta$ (Clapham and Neer, 1997; Fletcher et al., 1998) y 12 para la subunidad $G\gamma$ (Huang et al., 1999; Ray et al., 1995), resultando en un gran número de combinaciones del dímero $G\beta\gamma$. Una

de las primeras funciones que se identificaron para el dímero $G\beta\gamma$, fue la regulación de los canales de K^+ (Logothetis et al., 1987). También se sabe que el dímero $G\beta\gamma$ regula cinasas como la fosfoinosítido-3 cinasa- γ (PI3K γ), la cual participa en la vía de señalización en leucocitos (Maier et al., 2000; Maier et al., 1999; Stephens et al., 1994; Stephens et al., 1997). En otros estudios se han reportado que el dímero $G\beta\gamma$ puede regular positiva y negativamente a isoformas de la adenilato ciclasa y proteínas G pequeñas (McCudden et al., 2005).

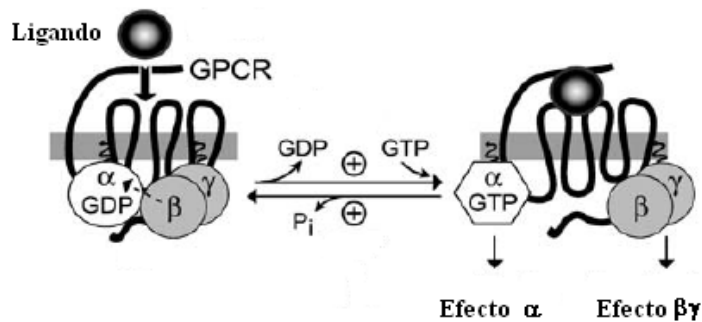


Figura 2. Modelo estándar del intercambio de GDP/GTP en la vía de señalización de los GPCRs. En ausencia del ligando la subunidad $G\alpha$ está unida al dímero $G\beta\gamma$. La unión del ligando al receptor induce un cambio conformacional en la subunidad $G\alpha$, permitiendo el intercambio de GTP por GDP. La proteína G se disocia en el dímero $G\beta\gamma$ y en el monómero $G\alpha$, generando un efecto (modificado de McCudden et al., 2005).

La activación de los receptores se lleva a cabo a través de sus agonistas, lo que provoca que el receptor interactúe con la proteína G heterotrimérica a través de las subunidades α y $\beta\gamma$, modulando la actividad de los efectores de membrana que inducen a distintas enzimas (adenilil ciclasa, fosfodiesterasas y diferentes tipos de fosfolipasas) y canales iónicos. Estos efectores de membrana generan segundos mensajeros (tales como AMP cíclico, diacilglicerol, o inositol trifosfato) y alteran la concentración intracelular de iones (tales como Ca^{2+} , Na^+ , K^+), lo que provoca

cascadas de fosforilación/desfosforilación, propagando así las señales intracelulares para producir las acciones finales (Vázquez-Prado et al., 2003).

1.3 DESENSIBILIZACION

Los receptores sufren diversos procesos de regulación. Uno de ellos es la desensibilización que se define como una disminución en la respuesta del receptor al ser estimulado por su agonista; conceptos actuales señalan que una vez que el agonista se une a su receptor, éste se fosforila por la acción de diferentes cinasas, lo que desencadena una serie de procesos por los cuales los GPCRs presentan una atenuación en su respuesta (Krupnick et al., 1997). Existen dos tipos de desensibilización, la homóloga y la heteróloga.

Desensibilización homóloga

La desensibilización homóloga se lleva a cabo en presencia del agonista, este tipo de desensibilización frecuentemente involucra la fosforilación de los GPCRs por cinasas de receptores acoplados a proteínas G (por sus siglas en inglés GRKs) (Ferguson et al., 1998). Estas proteínas forman una familia de 7 cinasas que fosforilan a los GPCRs en el estado de unión del agonista al receptor (Premont et al., 1995; Sallese et al., 1997; Yang and Xia, 2006). Esta fosforilación estimula la unión de unas proteínas claves denominadas β -arrestinas, provocando su internalización y como consecuencia la desensibilización de los receptores (Drake et al., 2006; Luttrell and Lefkowitz, 2002; McDonald and Lefkowitz, 2001; Tohgo et al., 2003).

Existen dos tipos de β -arrestina, la tipo 1 y la tipo 2; éstas son proteínas de andamiaje que se unen al receptor fosforilado, desacoplándolo de la vía de transducción de señales impidiendo que el receptor interactúe con las proteínas G (Ferguson et al., 1996; Lohse et al., 1989); otra función de las arrestinas es acoplar al receptor a otras proteínas de andamiaje llamadas clatras. La interacción entre ambas proteínas forma un complejo receptor- β arrestinas con las clatras e inducen la endocitosis. Tanto las GRKs como las β -arrestinas son necesarias para iniciar el proceso de secuestro de los receptores (Ahn et al., 2004; Luttrell et al., 1999). De esta manera el receptor fosforilado es internalizado (Figura 3).

Posteriormente los receptores pueden reciclarse a la membrana plasmática o degradarse intracelularmente. El proceso de internalización es indispensable ya que existen fosfatasa específicas capaces de desfosforilarlos intracelularmente y permitir que se incorporen nuevamente a la membrana plasmática en su forma no desensibilizada (Shenoy and Lefkowitz, 2003; Zhang et al., 1997).

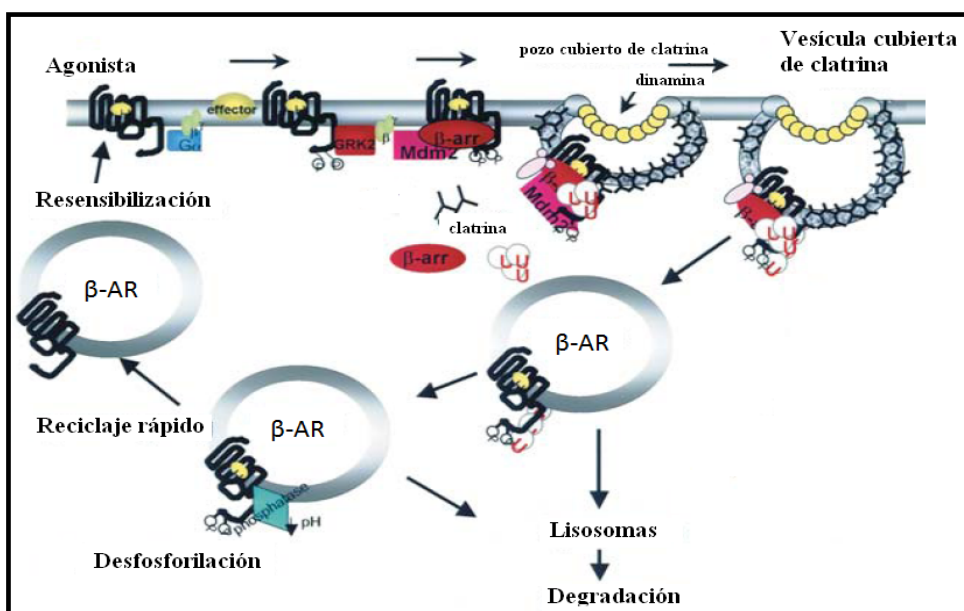


Figura 3. Internalización de los receptores acoplados a proteínas G (modificada de Shenoy y Lefkowitz 2003) .

Desensibilización heteróloga

Este tipo de desensibilización se lleva a cabo en ausencia del agonista. Se ha observado que muchos GPCRs son desensibilizados a través de otros receptores incluyendo algunos con actividad de tirosina cinasa (Casas-González and García-Sáinz, 2006; Molina-Muñoz et al., 2008; Rodríguez-Pérez et al., 2009; Romero-Ávila et al., 2002), o a través de otros GPCRs (Casas-González et al., 2000). También se ha observado este tipo de desensibilización vía regulación por retroalimentación negativa o “feedback” por cinasa activadas por segundos mensajeros, tales como la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa C (PKC). En estos casos cualquier agonista que pueda incrementar el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) o el diacilglicerol tiene potencial de inducir la fosforilación y desensibilización de GPCRs que contengan sitios consenso de fosforilación para estas cinasas (Casas-González and García-Sáinz, 2006; Casas-González et al., 2000; Molina-Muñoz et al., 2008; Rodríguez-Pérez et al., 2009; Vázquez-Prado et al., 2003).

Unas de las cinasas importantes involucradas en la fosforilación de receptores adrenérgicos son las proteínas cinasas C (PKC). Estas han sido divididas en 4 familias; las convencionales que incluyen a las isoformas PKC α , PKC β y PKC γ , que están constituidas por dos dominios, uno para la unión de diacilglicerol, fosfolípidos y ésteres de forbol (TPA) y el otro dominio es calcio dependiente. Las originales o noveles incluyen las isoformas PKC δ , PKC ϵ , PKC θ y PKC η , éstas son

similarmente activadas por diacilglicerol y fosfolípidos pero no directamente por calcio (Mellor and Parker, 1998). Las atípicas que están formadas por las isoformas PKC ι y PKC λ/ζ , las cuales no son activadas por calcio o diacilglicerol. Por último la familia PKN que incluyen las PKN1, PKN2 y PKN3, que comparten un dominio de unión para la familia de de GTPasas Rho y Rac (Rosse et al., 2010).

1.4 RECEPTORES QUIMERICOS

Con la finalidad de conocer y aclarar muchas dudas sobre la estructura y función de los receptores en general y en particular de los acoplados a proteínas G, en años recientes se ha tomado el enfoque de crear receptores quiméricos como una forma de probar la relación estructura-función del receptor (Lefkowitz, 2004).

Como bien se sabe, existen diferencias importantes en la estructura entre receptores miembros de la misma subfamilia tanto en las asas intracelulares con las que se relacionan con las proteínas G, como en las asas extracelulares a través de las cuales interaccionan con los ligandos, el extremo amino extracelular y el extremo carboxilo que es el blanco de fosforilación del receptor. Muchos descubrimientos importantes en la estructura y función de los receptores acoplados a proteínas G han resultado del uso de los receptores quiméricos (Gehret and Hinkle, 2009; Vázquez-Prado et al., 2000; Yin et al., 2004)

1.5 ADRENALINA

Hace más de 100 años en 1885, Oliver y Schäfer reportaron que un extracto de la médula suprarrenal producía efectos cardiovasculares importantes en la rana y el perro. Estos investigadores también mostraron que la administración de extractos suprarrenales incrementaban la contractibilidad en el músculo esquelético (Oliver and Schafer, 1895). Debido a estos hallazgos y tratando de entender que sustancia era la encargada de causar estos efectos fisiológicos, John Abel, quien trabajaba en la Universidad de Johns Hopkins y su colaborador Crawford, reportaron por primera vez en 1897 al principio activo aislado de la glándula suprarrenal, al cual lo llamaron “epinephrin” (epinefrina) (Abel and Crawford, 1897). Pocos años después un japonés, Jochiki Takamine reportó que había aislado el principio activo de las glándulas suprarrenales y que tenía la función de un potente vasoconstrictor y lo llamó “adrenaline” (adrenalina) (García-Sáinz, 1995; Takamine, 1902).

La noradrenalina y la adrenalina son catecolaminas que se sintetizan a partir de la tirosina como se muestra en la figura 4.

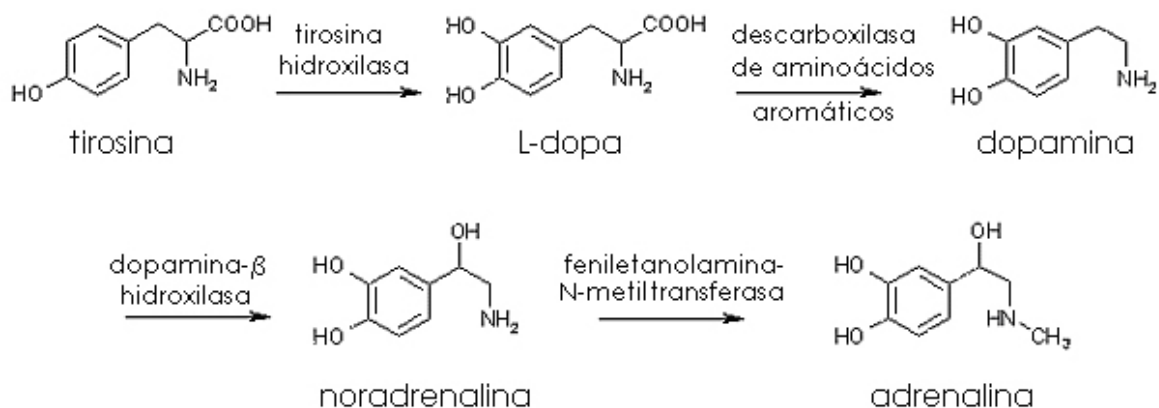


Figura 4. Biosíntesis de catecolaminas. Se muestran las enzimas y los intermediarios de la síntesis de la adrenalina y noradrenalina

La adrenalina y la noradrenalina ejercen su efecto dependiendo de las células que las sintetizan y la forma en que son liberadas. Se consideran neurotransmisores cuando son sintetizadas en las neuronas adrenérgicas y se liberan en vesículas y se consideran hormonas cuando son sintetizadas en las glándulas suprarrenales.

Todas las acciones que llevan a cabo la adrenalina y la noradrenalina son a través de los receptores adrenérgicos y el primero en introducir el término de receptor fue Langley en 1905, en donde mencionó que las sustancias actúan sobre receptores en las células: “La adrenalina es una secreción interna que actúa sobre sustancias receptivas” (Langley, 1905).

1.6 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Varios años después, en 1948, Raymond Ahlquist identificó a los receptores adrenérgicos y tentativamente llamó al primer tipo de receptores adrenérgicos, receptor α y al segundo tipo lo llamó receptor β (Ahlquist, 1948). Pero la importancia de este descubrimiento no fue considerada sino hasta después de una década.

Metodologías para el estudio de los receptores α_1 -adrenérgicos fueron apareciendo, como el ensayo de unión a ligando (BINDING). Debido a este avance se encontró la primera evidencia fuerte de la diferencia farmacológica entre los subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos, la cual se describió por Morrow y Creese (1986), quienes estudiaron en membranas de cerebro de ratón la

unión de la [³H]-prazosina y cómo esta unión es inhibida por WB4101 (2-(2,6-dimethoxyphenoxyethyl)-aminomethyl-1,4 benzodioxane) y por fentolamina, pero no por una variedad de otros antagonistas, lo que hizo concluir que existen dos distintos subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos marcados con [³H]-prazosina. El receptor α_{1A} el cual tiene una alta afinidad por WB4101 y fentolamina; el receptor α_{1B} tiene una afinidad menor por los mismos antagonistas (Zhong and Minneman, 1999).

El estudio de estos receptores se revolucionó por la biología molecular: técnicas de clonación revelaron inicialmente 4 subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos. El primero que fue clonado fue el receptor α_{1B} -adrenérgico de hamster (Cotecchia et al., 1988). Otros 3 también se clonaron, el receptor α_{1A} -adrenérgico de rata (Lomasney et al., 1991), el α_{1C} -adrenérgico de bovino (Schwinn et al., 1990) y el α_{1D} -adrenérgico de rata (Pérez et al., 1991). Sin embargo, el α_{1A} - y el α_{1D} -mostraron 99.8% de identidad, lo que indicó que se trataba de un mismo receptor al cual se le conoce actualmente como α_{1D} - y el α_{1C} - fue reclasificado como α_{1A} -adrenérgico (Docherty, 2009).

Los tres subtipos de los receptores α_1 -adrenérgicos han sido secuenciados y clonados y se conoce la secuencia específica de aminoácidos de cada uno de ellos (figura 5).

Familia de receptores adrenérgicos.

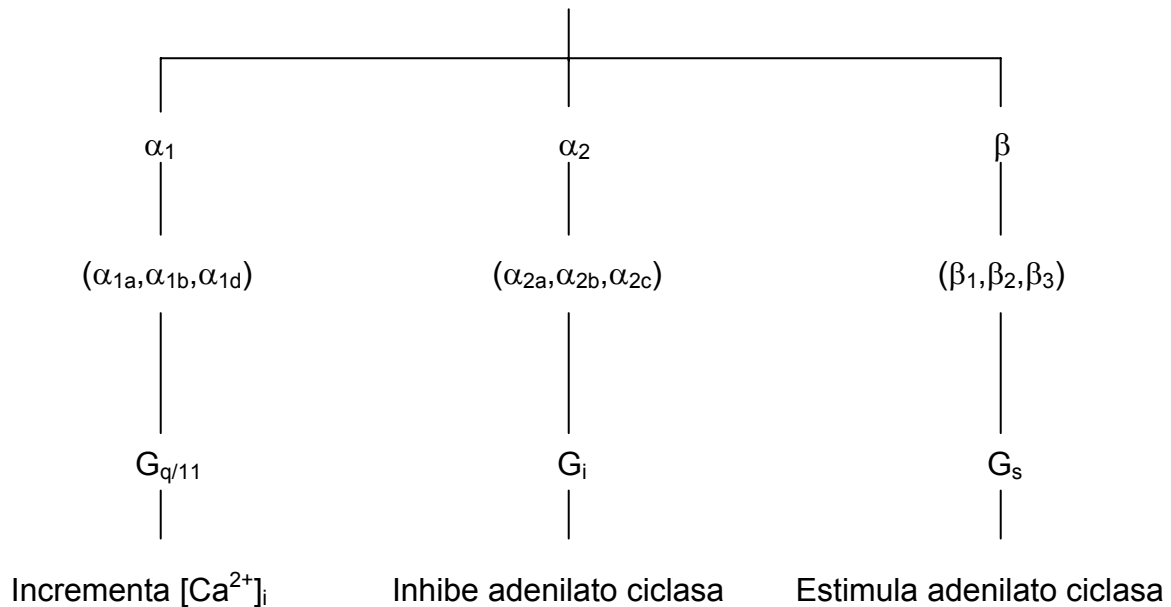


Figura 6. Familia de adrenoceptores dividida en 3 subfamilias basadas en las propiedades farmacológicas, homología estructural y mecanismos de señalización.

Vía de transducción

Uno de los sistemas de transducción de señales mejor conocido es la vía de recambio de fosfolípidos calcio. Los receptores α_1 -adrenérgicos utilizan este sistema acoplándose a proteínas de la familia $G_{q/11}$, el efector principal de estas proteínas es la fosfolipasa C (PLC). La PLC hidroliza al fosfolípido de membrana, el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato liberando diacilglicerol (DAG) e inositol 4,5 trifosfato (IP_3). El acoplamiento del IP_3 a su receptor en el interior del retículo endoplasmático induce la liberación del Ca^{2+} intracelular, y simultáneamente con el DAG activan a la proteína cinasa C (PKC)(García-Sáinz et al., 2000; Piascik and Perez, 2001; Tanoue et al., 2003; Wu et al., 1992; Zhong and Minneman, 1999) como se muestra en la figura 7.

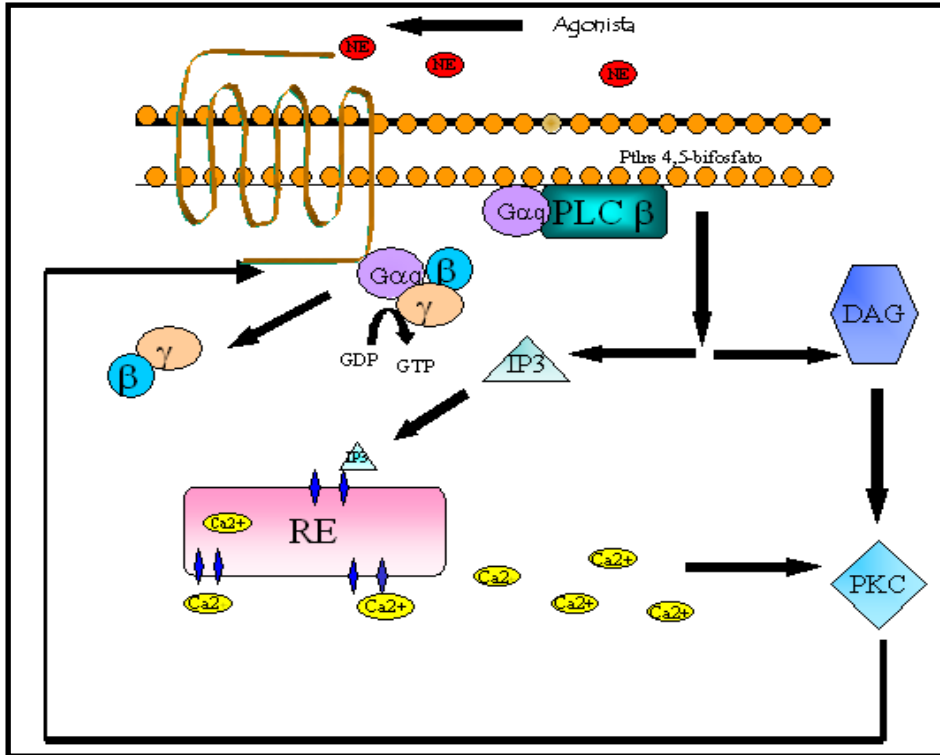


Figura 7. Vía de señalización del sistema de fosoinositidos-calcio. Norepinefrina (NE), fosfolipasa C β (PLCβ), Inositol Trifosfato (IP3), Diacil Glicerol (DAG), Proteína Kinasa C (PKC).

Estos receptores se encuentran localizados en muchos órganos como por ejemplo en cerebro, corazón, riñón y próstata y juegan un papel importante en el control de la contracción, en el sistema vascular y en el control de la presión sanguínea.

Los receptores α_1 -adrenérgicos participan en diversas acciones fisiológicas siendo una de las más importantes el control de la presión sanguínea (Bylund et al., 1994; Minneman and Esbenshade, 1994; Piascik et al., 1990; Sanbe et al., 2009). Además, también participan en muchas otras funciones importantes en el organismo, como la neurotransmisión autónoma en el control cardiovascular, respiratorio, genitourinario y funciones gastrointestinales (Chen et al., 2005), en modulación de las vías metabólicas (Ulahannan et al., 2002); en contracción del

músculo liso y del metabolismo hidroelectrolítico entre otras. La participación de los receptores α_1 -adrenérgicos en distintos estados patológicos como en la hipertrofia prostática benigna enfatizan su importancia (García-Sáinz et al., 1999).

2. ANTECEDENTES y JUSTIFICACION

La fosforilación se considera como el paso inicial en el proceso de desensibilización. Existe evidencia de que los receptores α_{1A} y α_{1B} son regulados de distinta manera por ésteres de forbol; por ejemplo, en los hepatocitos que expresan naturalmente distintos subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos se ha observado que tienen diferente sensibilidad a los efectos reguladores de la PKC (García-Sáinz et al. 1995).

En fibroblastos RAT-1, en donde se pueden expresar de manera diferente los tres subtipos de receptores por transfección estable, se logró determinar la diferencia en la sensibilidad entre estos receptores al efecto bloqueador del TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Se reportó que el subtipo α_{1d} -adrenérgico es el más sensible, el subtipo α_{1b} -adrenérgico tiene una sensibilidad intermedia y el α_{1a} -adrenérgico es el menos sensible al efecto del TPA (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996).

Resultados reportados por nuestro grupo de trabajo indican que el receptor α_{1A} -adrenérgico es pobremente desensibilizado por acción de TPA y el estado de fosforilación es menor en condiciones similares con respecto al receptor α_{1B} -adrenérgico. Con esta información se decidió determinar la influencia de los extremos carboxilo de los receptores α_{1A} - y α_{1B} adrenérgicos en la fosforilación. Un enfoque fue construir receptores quiméricos intercambiando la cola carboxilo de ambos receptores lo que demostró que el receptor nativo α_{1A} adrenérgico es pobremente fosforilado y en la quimera α_{1AB} , el nivel de fosforilación fue similar al

receptor nativo α_{1B} adrenérgico demostrando la importancia de la cola del carboxilo de estos receptores en este proceso (Vázquez-Prado et al., 2000). Otra estructura importante que se ha demostrado que esta involucrada en la fosforilación y desensibilización de diferentes GPCRs, como el de dopamina (Cho et al., 2010) y para angiotensina (AT1) (Olivares-Reyes et al., 2001) es la tercera asa intracelular.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Si en la cola carboxílica y/o en la tercer asa intracelular de los receptores α_{1a} y α_{1b} adrenérgicos existen sitios de regulación por fosforilación, entonces al eliminar estos sitios se modificará la sensibilidad de los receptores.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la fosforilación y desensibilización de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos transfectados establemente en células HEK293.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Cuantificar el número de receptores en las células transfectadas.
- Determinar el estado de fosforilación de los receptores inducida por la estimulación con TPA y norepinefrina.
- Conocer si existe un proceso de desensibilización por la activación de la PKC empleando TPA en células que expresen los receptores truncados.
- Determinar la funcionalidad, desensibilización y fosforilación de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos mutados.
- Conocer si existe un proceso de internalización por la activación de la PKC y mediante el estímulo con NA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El medio modificado Dulbecco's Eagle Medium (DMEM), el antibiótico G418, el suero fetal bovino y otros reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco BRL. La (-) norepinefrina, el propranolol, la fentolamina, la yohimbina y los reactivos de uso general se obtuvieron de Sigma Chemical Co. El [³²P]Pi (8500-9120 Ci/mMol) se obtuvo de New England Nuclear Life Science Products; la [³H] tamsulosina (56.3Ci/mmol) fue un regalo de Yamanouchi Europe (Leiderdorp, The Netherlands). La proteína A acoplada a sefarosa se obtuvo de Upstate Biotechnology. El Fura-2AM (ácido 1-[2-(5-carboxioxazol-2-11)-6-aminobenzofurano-5-oxi]-2-2 (2' amino-5' metilfenoxi)-etano-N,N', N-tetra acético, penta acetoximetil éster) se obtuvo de Molecular Probes.

4.1 CULTIVO CELULAR

Se utilizaron células HEK293 (Human Embryonic Kidney 293 por sus siglas en inglés), las cuales se transfectaron establemente usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen), con los receptores adrenérgicos α_{1A} de bovino y α_{1B} de hamster, generosamente donados por los Drs. R. J. Lefkowitz, M. G. Caron y L. Allen de la Universidad de Duke. Los receptores quiméricos α_{1AB} , y α_{1BA} adrenérgicos se construyeron en el laboratorio intercambiando la cola carboxilo entre los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos como se indica en (Vázquez-Prado et al., 2000). Las células se cultivaron en medio DMEM con alta glucosa y glutamina adicionado con 10% de suero fetal bovino, 600 μ g/ml del análogo de neomicina G-418 sulfato, 100 μ g/ml de estreptomina, 100U/ml de penicilina a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂.

4.2 Determinación de la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$

Los experimentos se realizaron en células incubadas toda la noche con medio DMEM sin suero ni antibióticos. Al día siguiente, las células se incubaron previamente con Fura-2/AM $[5\mu M]$ durante una hora, en una solución de 5 ml de medio Krebs-Ringer-Hepes-Glucosa (NaCl 120 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, $MgSO_4$ 1.2 mM, KCl 4.75 mM, glucosa 10 mM, Hepes 20mM, $CaCl_2$ 1.27 mM, albúmina sérica bovina 0.05%, pH 7.4) con 0.05% de albúmina de suero bovino a pH 7.4 durante 45 minutos a $37^\circ C$ en una atmósfera de 5% de CO_2 . Las mediciones de $[Ca^{2+}]_i$ se hicieron en un espectrofluorómetro AMINCO-Bowman serie-2, con longitudes de onda de 340nm y 380nm de excitación y 510nm de emisión, finalmente la concentración intracelular de calcio se calculó según (Grynkiewicz et al., 1985) usando el software de AMINCO-Bowman.

4.3 Ensayo de union a ligando (Binding)

Los experimentos se realizaron en membranas de cultivos celulares confluentes. Se obtuvieron las membranas de acuerdo al método de Mattingly et al., en 1992 y se resuspendieron en 4 ml de solución amortiguadora de Tris- $MgCl_2$ (Tris 50mM, $MgCl_2$ mM pH7.5). La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La reacción se llevó a cabo en un volumen de $250\mu l$ durante 1hr a $30^\circ C$, en agitación. Se usó el buffer Tris- $MgCl_2$ arriba descrito, al cual se le adicionó $[^3H]$ tamsulosina (56.3 Ci/mmol) en diferentes concentraciones. La reacción se inició agregando membranas aisladas (10-25 μg de proteína). Para determinar la unión inespecífica se usó fentolamina ($1\mu M$). Se paró la reacción con el buffer Tris- $MgCl_2$ frío y las muestras se filtraron en un aparato Brandell con

filtros Whatman GF/C y lavadas 3 veces con el mismo buffer, los filtros se colocaron en tubos a los cuales se les agregó 5ml de líquido de centelleo y se leyeron en un contador BECKMAN.

4.4 Fosforilación de los receptores

Los experimentos de fosforilación se realizaron con cultivos confluentes en pozos de 35mm ayunado previamente durante 18 horas. Las células se incubaron en medio DMEM libre de fosfatos por 1 hora, posteriormente se marcaron metabólicamente durante 4 horas en medio DMEM sin fosfatos con [³²P]Pi 50μCi/ml para células que expresan α_{1B}, α_{1BA} y α_{1AB} y con 150μCi/ml para el α_{1A} y el α_{1AΔCOOH}. Las células marcadas se estimularon con norepinefrina y con TPA y se detuvo la reacción lavando dos veces con buffer de fosfatos salino frío.

Las células se lisaron en frío durante una hora con un buffer que contenía Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Tritón 1%, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 100μM, β-glicerofosfato 10mM, Na₄P₂O₇ 10mM, p-Serina 1mM, p-Tirosina 1mM, p-Treonina 1mM, EDTA 5mM, leupeptina 20 μg/ml, aprotinina 20 μg/ml, fluoruro de fenil-sulfonilo (PMSF) 100 μg/ml y con inhibidor de tripsina de soya 50 μg/ml. Los extractos se colectaron y se centrifugaron a 10,000 x g o 13,000 rpm por 15 minutos. Los sobrenadantes se incubaron con anticuerpos dirigidos contra el extremo carboxilo de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos, y con un anticuerpo anti GFP y proteína A-sefarosa.

Se incubaron toda la noche a 4°C y posteriormente se llevaron a cabo 5 lavados con una solución que contiene: Hepes 100 mM, NaHPO₄ 50 mM, NaF 10 mM, Tritón 10 %, SDS 5 % a pH 7.2. Finalmente las muestras se desnaturalizaron

hirviéndolas en buffer de cargado (SDS al 10%, Tris 1M pH 6.8, 10% de glicerol, 10% de β -mercapto etanol y 0.01% de azul de bromofenol) y se sometieron a geles desnaturizantes SDS-PAGE. Los geles se secaron y expusieron toda la noche en una placa del sistema PhosphorImager de Molecular Dynamics y se cuantificaron usando el programa Image Quant.

4.5 Construcción de las proteínas de fusión con los receptores truncados sin el extremo carboxilo.

Se amplificaron por PCR las secuencias de los receptores α_{1A} y $\alpha_{1A\Delta COOH}$ adrenérgicos, utilizando como molde los receptores clonados en el vector pCDNA3.1. Los productos de PCR fueron clonados en el vector pCEFLP (donado por el Dr. José Vázquez Prado del CINVESTAV), para generar receptores fusionados con la proteína verde fluorescente EGFP (por sus siglas en inglés Enhanced Green Fluorescent Protein), fusionada en el extremo amino y en el plásmido pEGFP-N1 (Clontech) (figura 8 panel izquierdo) para generar receptores fusionados con la EGFP fusionada en el extremo carboxilo (figura 8 panel derecho).

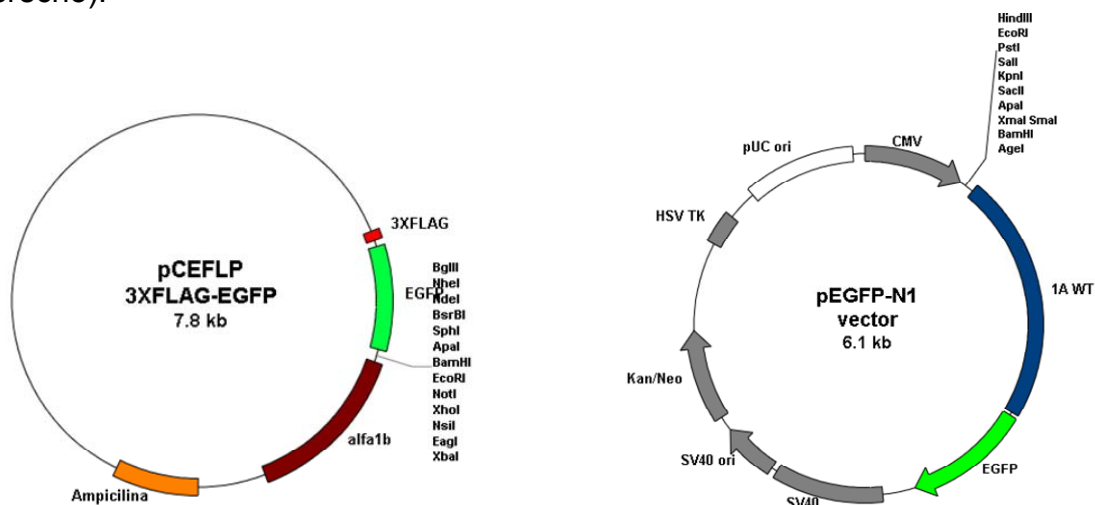


Figura 8. Vectores para generar proteínas de fusión. Vectores utilizados para generar proteínas de fusión para los receptores α_{1A} y $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -adrenérgicos. Panel izquierdo pEGFP-N1, panel derecho pECFLP

Se diseñaron oligonucleótidos que amplificaron al receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ truncado sin el extremo carboxilo y al receptor α_{1A} completo.

Los oligonucleótidos diseñados constaban de una secuencia reconocida por la endonucleasa específica, una secuencia pequeña que facilita el reconocimiento de la secuencia de iniciación de la traducción conocida como secuencia “kozac” y la secuencia del gen del receptor. A los oligonucleótidos antisentido para generar el receptor truncado se les agregaron dos codones de STOP, como se muestra a continuación:

Receptor α_{1A} con la EGFP en el extremo amino (eGFP- $\alpha_{1A\Delta COOH}$)

Sentido

5' CCGCTCGAG CCACC ATGGTGTTCCTCTCCGGAAATG 3'

XhoI

kozac

gen

Antisentido

5' CTAGTCTAGA CTATTA TCGTCGCAGACACTGGATTC 3'

XBAI

STOP

gen

Receptores α_{1A} y $\alpha_{1A\Delta COOH}$ con la EGFP en el extremo carboxilo (α_{1A} -eGFP y $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -eGFP)

Sentido para los dos receptores

5'-GCCGAATTCG ATGGTGTTTCTCTCCGGAAAT-3'

EcoRI

gen

Antisentido para el receptor completo

5'AGTGAAAATGGGGAGGAAGTCA GGGATCCAAA3'

gen

BamHI

Antisentido para el receptor truncado

5'-AATCCAGTGTCTGCGACGAA GGGATCCAAA-3'

gen

BamHI

Los productos de PCR se insertaron en los plásmidos correspondientes. Para comprobar que se hubieran hecho correctamente las construcciones, se secuenciaron los plásmidos, obteniendo la secuencia correcta para cada uno de ellos. Una vez que se verificaron las secuencias, los plásmidos con los receptores truncados sin el extremo carboxilo se transfectaron establemente en células HEK293.

4.6 Estudios de microscopía confocal

Se adquirieron las imágenes de células adheridas en cajas de 35mm con fondo de vidrio en 1ml de medio DMEM. Los estímulos fueron adicionados directamente sobre las células mientras las imágenes eran colectadas, se utilizó como marcador de membrana plasmática el FM 4-64 de Invitrogene, (N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(4-dietilamino)fenil)-hexatrienil) piridiniumdibromido el cuál se adicionó directamente a la muestra después de cada estímulo. Las imágenes se obtuvieron

con un microscopio confocal Olympus Fluoview FV 1000 con sistema de escaneo de laser espectral, acoplado a un microscopio de luz invertida OLYMPUS IX81. Se utilizó un objetivo de inmersión en glicerol a 60x 1.35 N.A. La GFP se excitó con láser de argón a 488nm y la fluorescencia emitida se detectó entre 500 y 530nm. El marcador de membrana FM4-64 se excitó con un láser de gas He-Ne a 543nm y la fluorescencia emitida se detectó entre 555 y 655nm. Todas las imágenes se colectaron con una apertura numérica de 1.3, el mismo porcentaje de láser, la misma apertura de iris y la misma ganancia. Las imágenes se procesaron usando el programa FV10-ASW.

4.7 Análisis estadístico

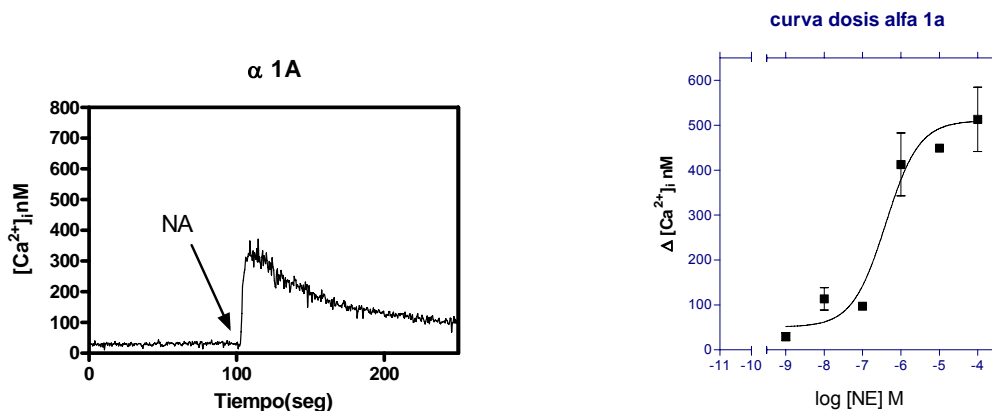
Los datos fueron analizados y graficados utilizando el software Prisma versión 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A los datos se les aplicó una análisis de varianza (ANOVA), prueba de Bonferroni comparando estadísticamente todos los grupos. Un valor menor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

5. RESULTADOS

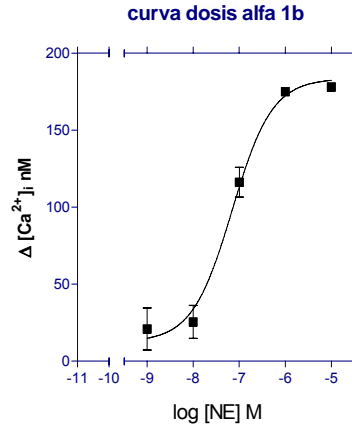
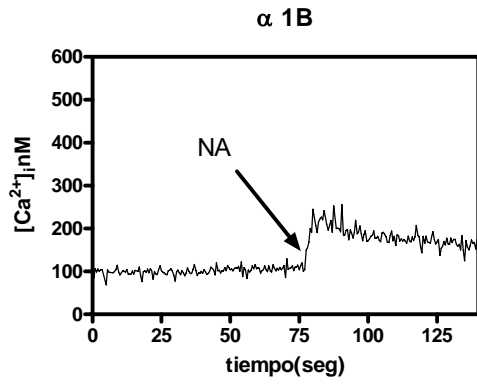
SEÑALIZACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN DE LOS RECEPTORES α_{1A} , α_{1B} , α_{1AB} Y α_{1BA} -ADRENÉRGICOS

Se evaluó la funcionalidad de los receptores α_{1A} , α_{1B} , α_{1AB} , α_{1BA} -adrenérgicos transfectados para expresión estable en las células HEK293. Se cuantificó la liberación de calcio intracelular inducidas por diferentes concentraciones de noradrenalina (NA), realizándoles curvas dosis respuesta. Se observó un incremento rápido y transitorio al estimular las células con NA, mostrando diferencias en la magnitud de la respuesta entre los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos (figura 9 A y B respectivamente). Estos resultados concuerdan con lo reportado por el laboratorio, observándose la misma tendencia para los receptores quiméricos (figura 9 C y D).

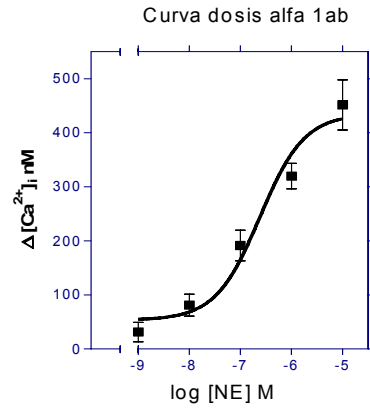
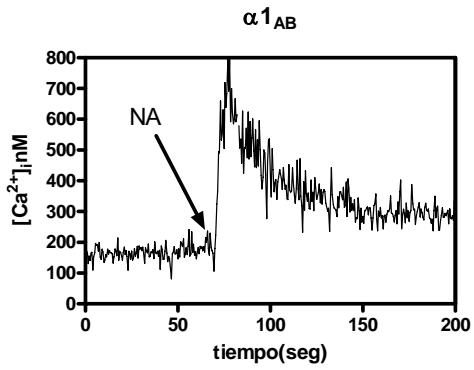
A



B



C



D

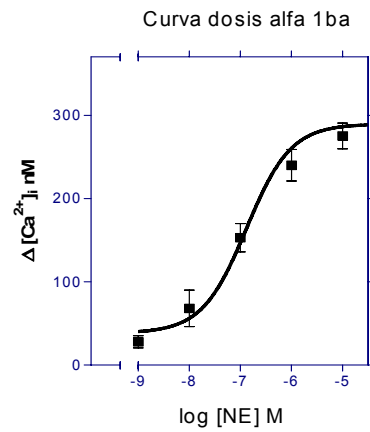
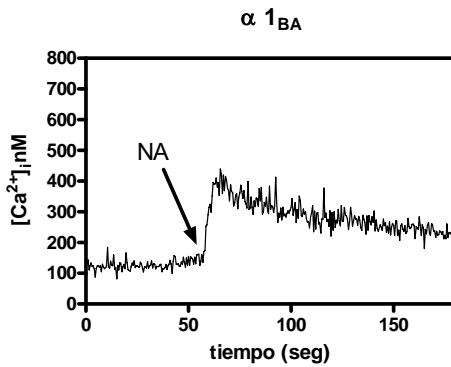


FIGURA 9. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por norepinefrina. Para la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$, las células transfectadas estables con los receptores adrenérgicos, se incubaron con 5 μ M de Fura-2AM por 1hr a 37°C. Paneles izquierdos: Trazo representativo de la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la estimulación de 10 μ M de NE. Paneles derechos: Curva dosis de NE a diferentes concentraciones en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$.

A pesar de que tiene la misma tendencia en la curva dosis respuesta, el receptor α_{1B} con el extremo carboxilo del α_{1A} (α_{1BA}), mostró un incremento de 100nM en la liberación de calcio intracelular comparándolo con el receptor α_{1B} -adrenérgico (figura 9 D). Tomando en cuenta estos resultados, se realizó la caracterización farmacológica mediante experimentos de unión a ligando de tipo saturante y de competencia utilizando [3 H] tamsulosina. Un dato interesante fue que la Kd aumenta cuando al receptor α_{1A} -adrenérgico se le intercambia el extremo carboxilo por el del α_{1B} (α_{1AB}) (TABLA 1), observando una diferencia importante ya que la Kd es mas de un orden magnitud a la del receptor α_{1A} -adrenérgico.

Una vez que se demostró que los receptores transfectados son funcionales y que su farmacología corresponde a los receptores adrenérgicos, lo siguiente fue conocer si existían diferencias en la sensibilidad a la PKC utilizando TPA como activador directo de esta cinasa.

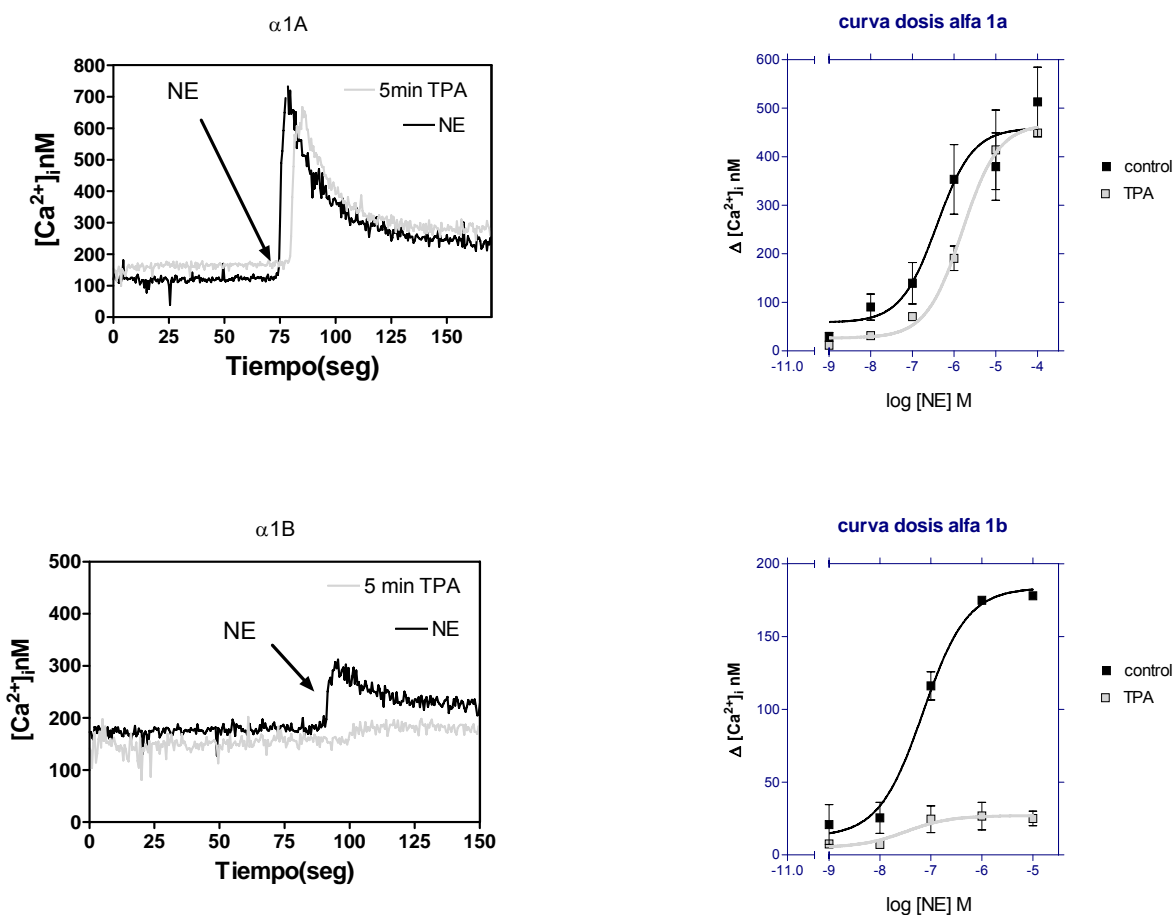
Tabla 1. Datos de ensayo de unión a ligando obtenidos de curvas de saturación utilizando [³H]tamsulosina

RECEPTOR	K _D (pM)	Bmax (fmol/mg proteína)
Wild-type α_{1A} -AR	26 \pm 2	285 \pm 91
Wild-type α_{1B} -AR	500 \pm 90	1195 \pm 275
α_{1AB} -AR chimera	510 \pm 30	689 \pm 275
α_{1BA} -AR chimera	450 \pm 30	415 \pm 125
α_{1A} -AR-eGFP	130 \pm 15	440 \pm 140
$\alpha_{1A\Delta COOH}$ -AR-eGFP	60 \pm 12	850 \pm 100
eGFP- $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -AR	50 \pm 10	155 \pm 50

Se ha reportado por Vázquez-Prado et al., en el 2000, que existen diferencias en la sensibilidad para la PKC entre los receptores α_{1A} y α_{1B} - adrenérgicos. Para demostrar si el extremo carboxilo está involucrado o es el responsable de esta diferencia, se estudió la sensibilidad de los receptores quiméricos a la PKC en la liberación de calcio intracelular.

Las células fueron incubadas con 1 μ M de TPA por 5 min, previos a la estimulación con su agonista NA. Se observó un aumento en la liberación de calcio intracelular y ese aumento fue dosis dependiente para los 4 receptores, lo que indica

diferencias en la sensibilidad a la PKC entre los receptores α_{1A} y α_{1B} , mostrando un corrimiento hacia la derecha en las curvas dosis-respuesta; este corrimiento fue más marcado para el receptor α_{1B} demostrando que el TPA desensibiliza de una manera muy clara en comparación con el α_{1A} (figura 10 paneles superiores línea gris). De manera interesante cuando el receptor α_{1A} tiene el extremo carboxilo del α_{1B} la sensibilidad para la PKC aumenta, pero más interesante aún es que para el receptor α_{1B} con el extremo carboxilo del α_{1A} la sensibilidad disminuye (figura 10 paneles inferiores).



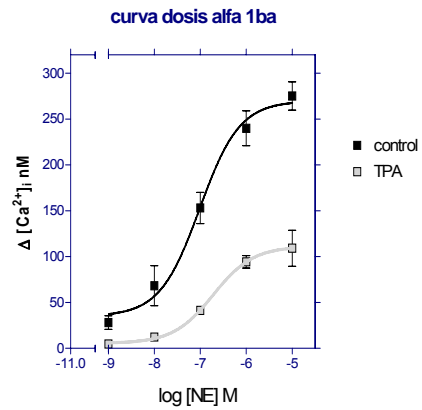
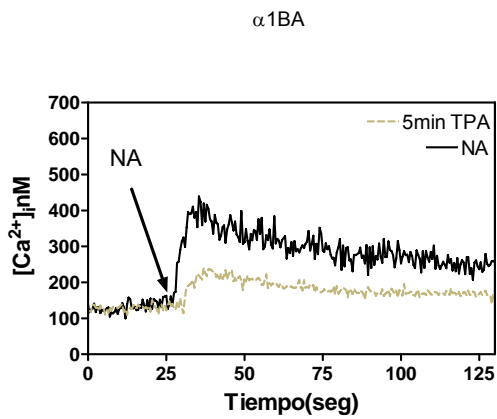
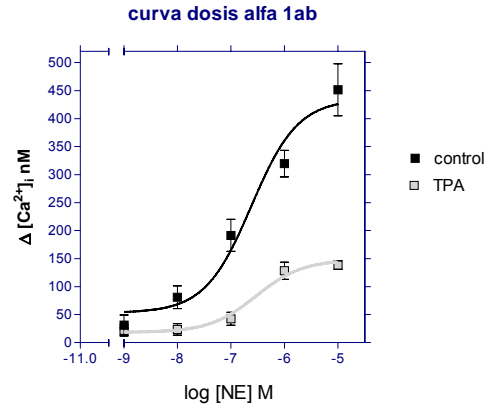
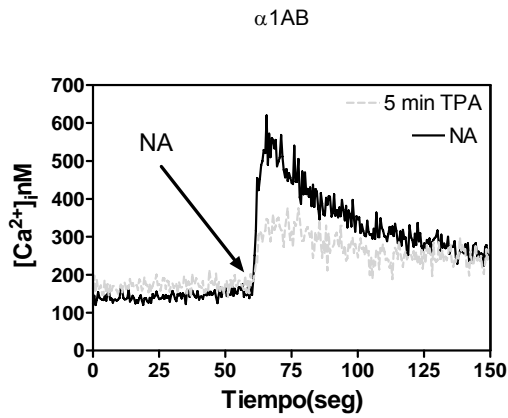
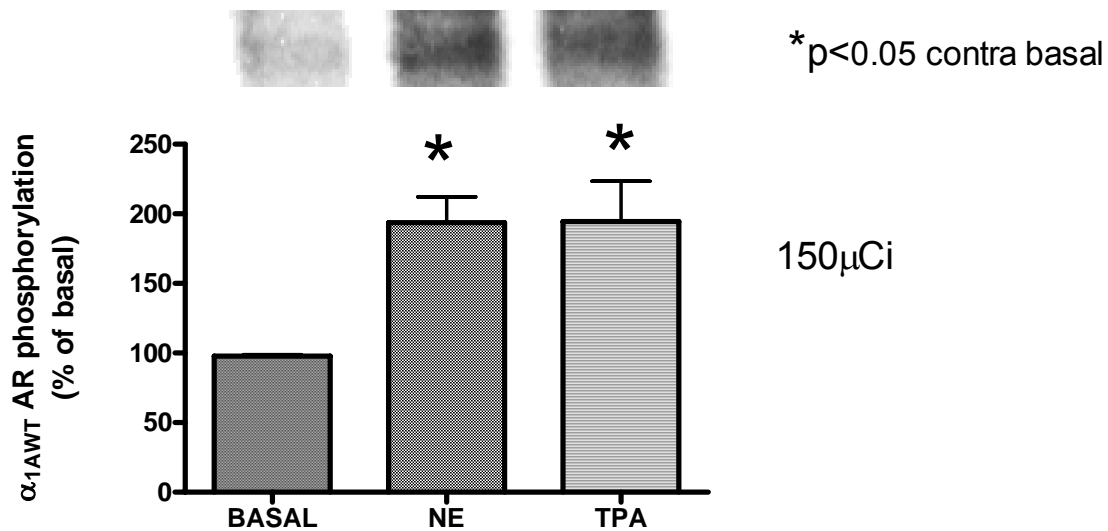


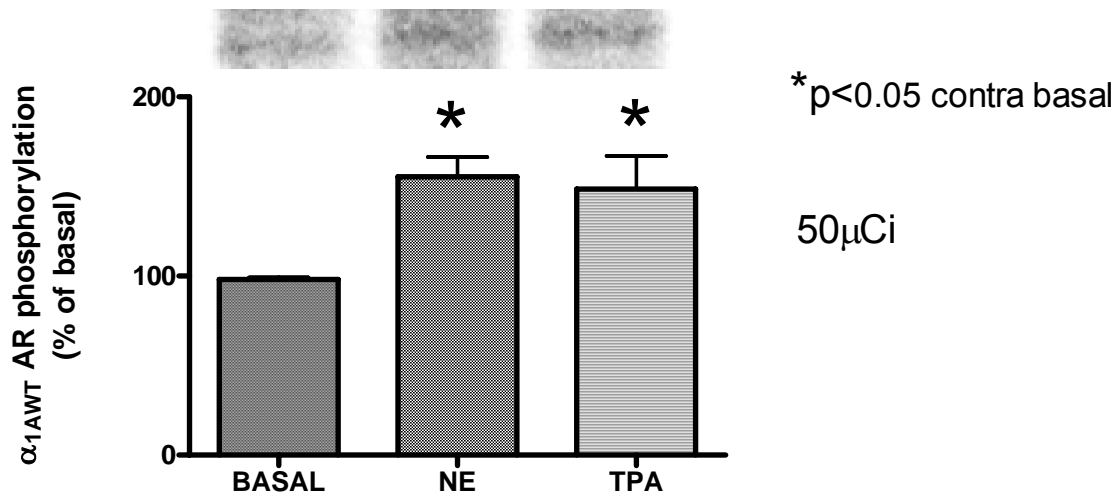
FIGURA 10. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por norepinefrina. Para la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ las células transfectadas estables con los receptores adrenérgicos se incubaron con $5\mu M$ de Fura-2AM por 1hr a $37^\circ C$. Paneles izquierdos: Trazo representativo de la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la estimulación de $10\mu M$ de NE, se agrega TPA $1\mu M$ 5min previos a las estimulación con NE. Paneles derechos: Efecto del TPA sobre la respuesta a NE a diferentes concentraciones en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$.

INMUNOPRECIPITACION DE LOS RECEPTORES FOSFORILADOS

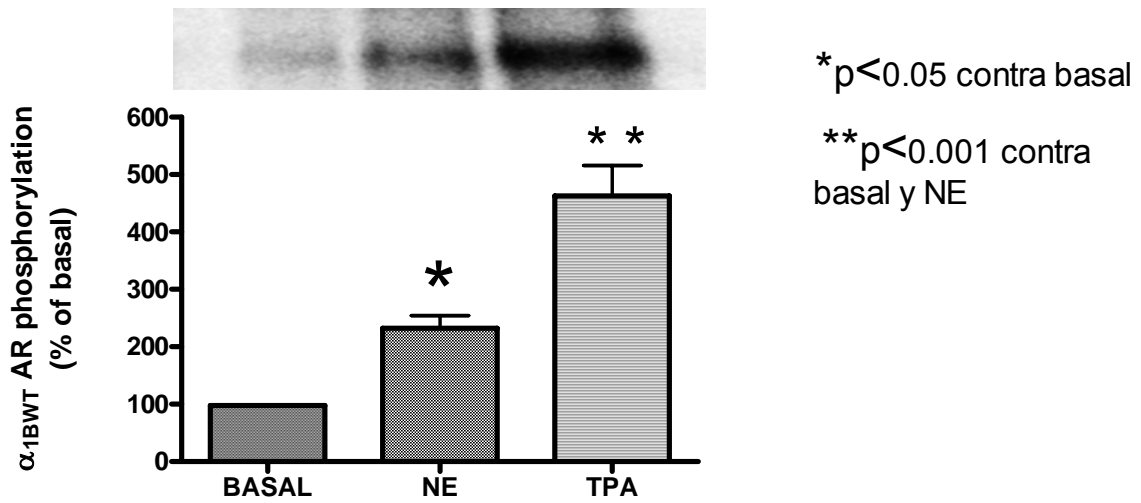
Los estudios de fosforilación de los receptores adrenérgicos mostraron que los receptores transfectados se encuentran como una fosfoproteína y su grado de fosforilación se incrementa significativamente al estimularlos con NA 10 μ M y con TPA 1 μ M (Figura 11). Estudios previos mostraron que el receptor α_{1A} -adrenérgico, en la mismas condiciones que el receptor α_{1B} -adrenérgico, se fosforila en menor intensidad; por tal causa se aumentó 3 veces la concentración del fósforo radiactivo, para corroborar que sí se fosforila el receptor. Como se muestra en la Figura 11, el receptor α_{1B} -adrenérgico se fosforila en mucha mayor intensidad que el α_{1A} -adrenérgico, pero cuando a estos receptores se les intercambié el extremo carboxilo, la intensidad de la fosforilación se observó también intercambiada entre ellos.

Fosforilación del receptor α_{1A} -adrenérgico

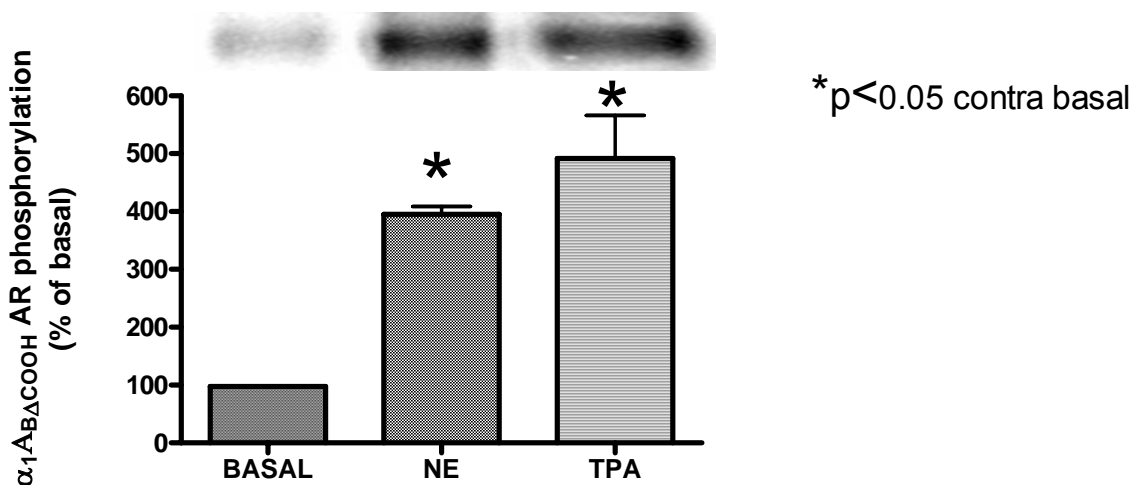




Fosforilación del receptor α_{1B} -adrenérgico



Fosforilación del receptor α_{1AB} -adrenérgico



Fosforilación del receptor α_{1BA} -adrenérgico

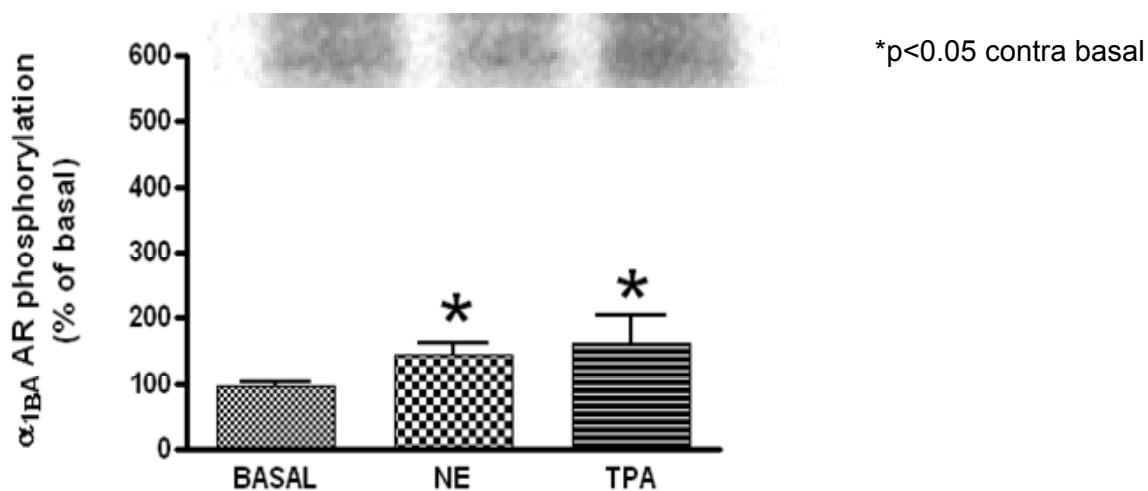


FIGURA 11. Efecto de la NE y TPA sobre la fosforilación de los receptores adrenérgicos α_{1A} , α_{1AB} , y α_{1BA} .

Las células HEK transfectadas establemente con los receptores fueron marcadas metabólicamente con [32 P] Pi durante 3 horas a 37°C, y se estimularon con 10 μ M de NA durante 5 min y con 1 μ M durante 15 min. El receptor α_{1A} fue marcado con 150 μ Ci/ml y con 50 μ Ci/ml. Los receptores α_{1B} , α_{1AB} y α_{1BA} fueron marcados con 50 μ Ci/ml.

Los datos hasta el momento señalaron que los receptores transfectados para expresarse establemente en las células HEK293 son funcionales, en respuesta a la unión con su ligando movilizan calcio, corresponden a la farmacología de los receptores adrenérgicos y se desensibilizan en respuesta a TPA, pero en los receptores quiméricos existe una desensibilización parcial, lo que nos podría indicar que no sólo el extremo carboxilo está participando en el proceso de desensibilización y fosforilación de los receptores adrenérgicos, sino que también se encuentra involucrada la tercera asa intracelular.

Para esclarecer que otros sitios probables de fosforilación pudieran tener los receptores α_{1A} , α_{1B} -adrenérgicos y los receptores quiméricos, se realizó un análisis *in silico*, mediante el uso de los programas Netphos 2.0 del NIH y Group-based Phosphorylation Scoring Method (GPS) Cuckoo Workgroup (Yu X et al., 2005). Se obtuvieron para el receptor α_{1A} - adrenérgico, 8 sitios en el extremo carboxilo y 7 en la tercer asa intracelular, como se muestra en la tabla 2 y en la figura 12 (panel superior). Para el receptor α_{1B} - adrenérgico, han sido reportados (Diviani et al., 1997) 5 sitios de fosforilación en el extremo carboxilo, y el análisis realizado nos mostró 8 sitios en la tercer asa intracelular como se muestra en la tabla 2 y en la figura 12 (panel inferior).

RECEPTOR α_{1A}			RECEPTOR α_{1B}		
TERCER ASA INTRACELULAR					
Posición	Cinasa	Secuencia	Posición	Cinasa	Secuencia
215	PKC, PKA	KRES R GL	233	PKC	AKRTTKN
220	PKC	GLKS S GLK	234	PKC, PKA	KRTTKNL
224	PKC	GLKT D KS	246	GRK	KEM S NSK
227	GRK, PKA	TDK S DSE	252	PKC	KELTLRI
229	PKC	KSD S EQV	264	GRK	NEDTLSS
250	PKC	GVT S AKN	266	PKC	DTL S SSTK
258	PKC	TNFS V RL	267	PKC	TL S SSTKA
EXTREMO CARBOXILO					
351	PKC	RKQ S SKH	394	PKC	RGG S LER
352	GRK	KQ S SKHT	400	PKC	RSQ S SRKD
384	PKC	SAET F YK	404	GRK	RK D SLDD
402	PKC	IF S SLPR	408	GRK	LDD S SGSC
420	PKC	SACT T AR	410	PKC	DSG S CMS
421	PKC	ACT T ARV			
442	GRK	STP S HGE			
451	PKC	QI P TIKI			

Tabla 2. Predicciones para fosforilaciones en serinas y treoninas de la tercera asa intracelular y del extremo carboxilo de los receptores α_{1A} y α_{1B} adrenérgicos.

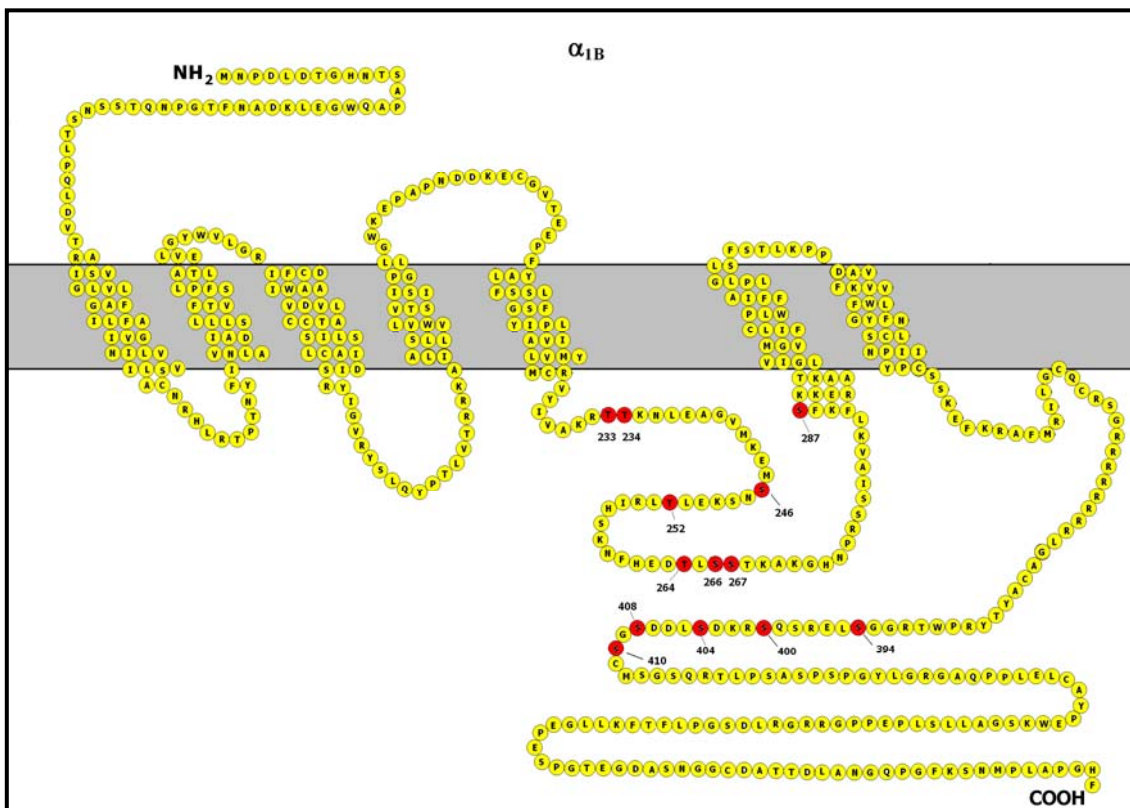
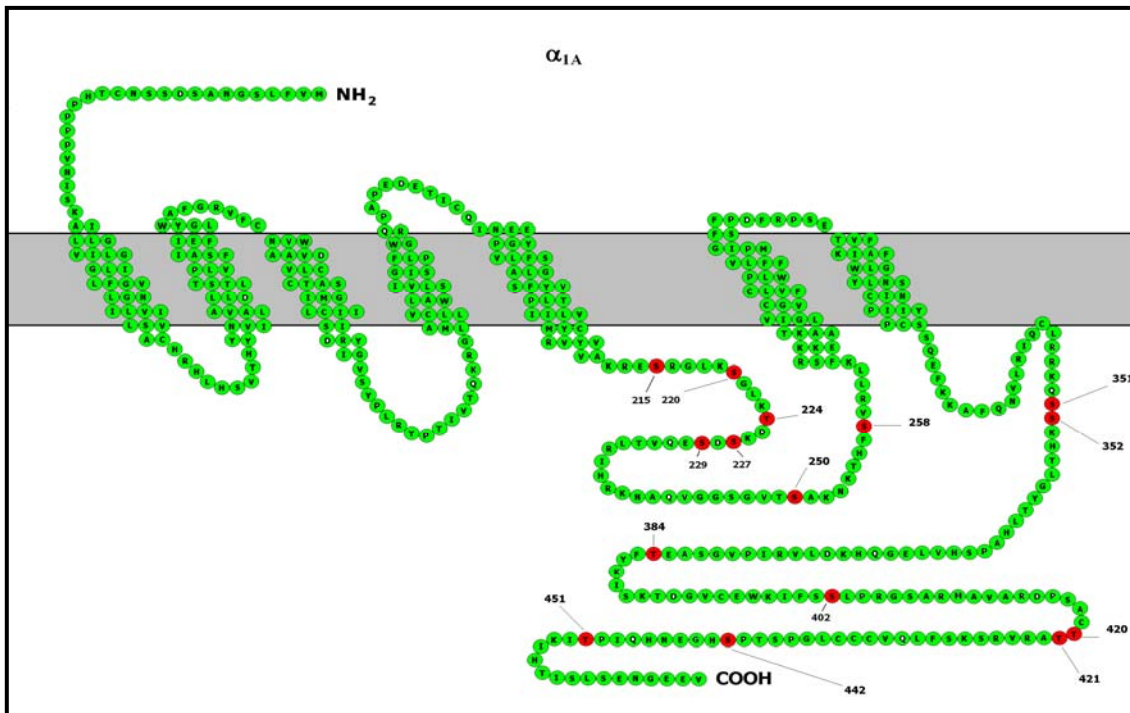
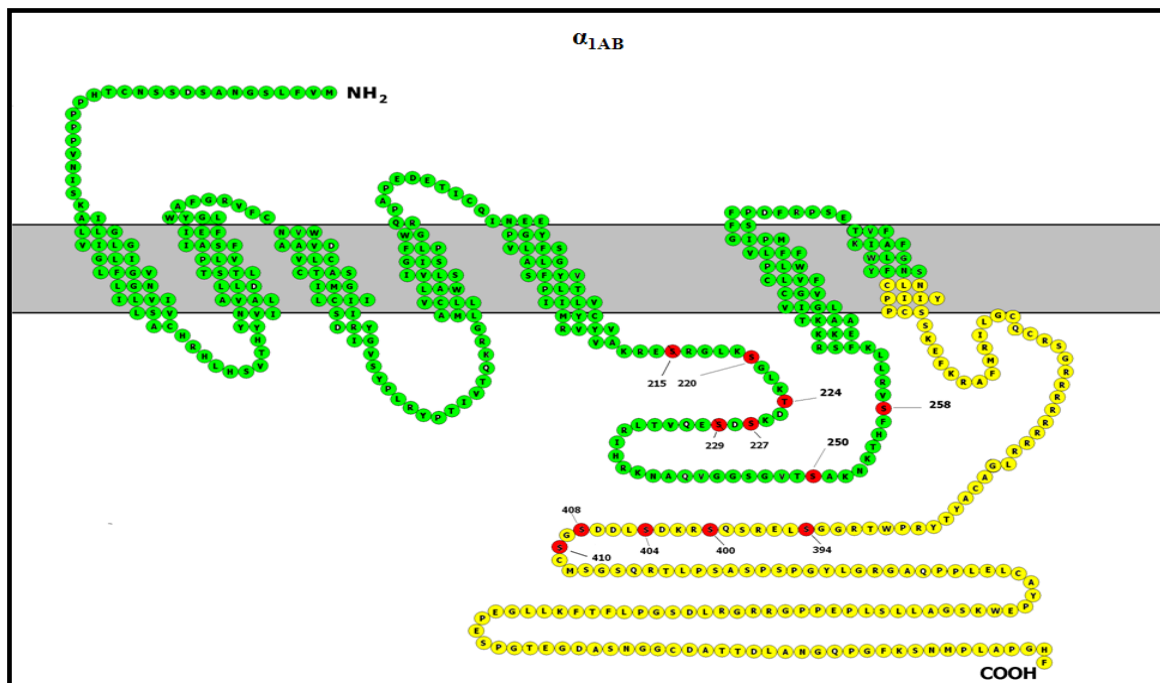


Figura 12. Esquema de los receptores α_{1A} (panel superior) y α_{1B} (panel inferior)- adrenérgicos. Los sitios probables de fosforilación están indicados en rojo.

En el panel superior de la figura 13 se muestra el receptor α_{1AB} , en verde se puede apreciar al receptor α_{1A} y en rojo los sitios probables de fosforilación, en amarillo el extremo del receptor α_{1B} con los 5 sitios de fosforilación los cuales son los responsables de aumentar la fosforilación del receptor α_{1A} . En el panel inferior de la figura 13 se observa al receptor α_{1BA} , en amarillo se ilustra al receptor α_{1B} con los sitios de fosforilación en rojo en la tercera asa y en verde el extremo carboxilo del receptor α_{1A} con los sitios probables de fosforilación en rojo. A pesar de que son 8 sitios lo que se localizan en el extremo del carboxilo la fosforilación de estos es en menor magnitud que los 5 sitios del receptor α_{1B} .



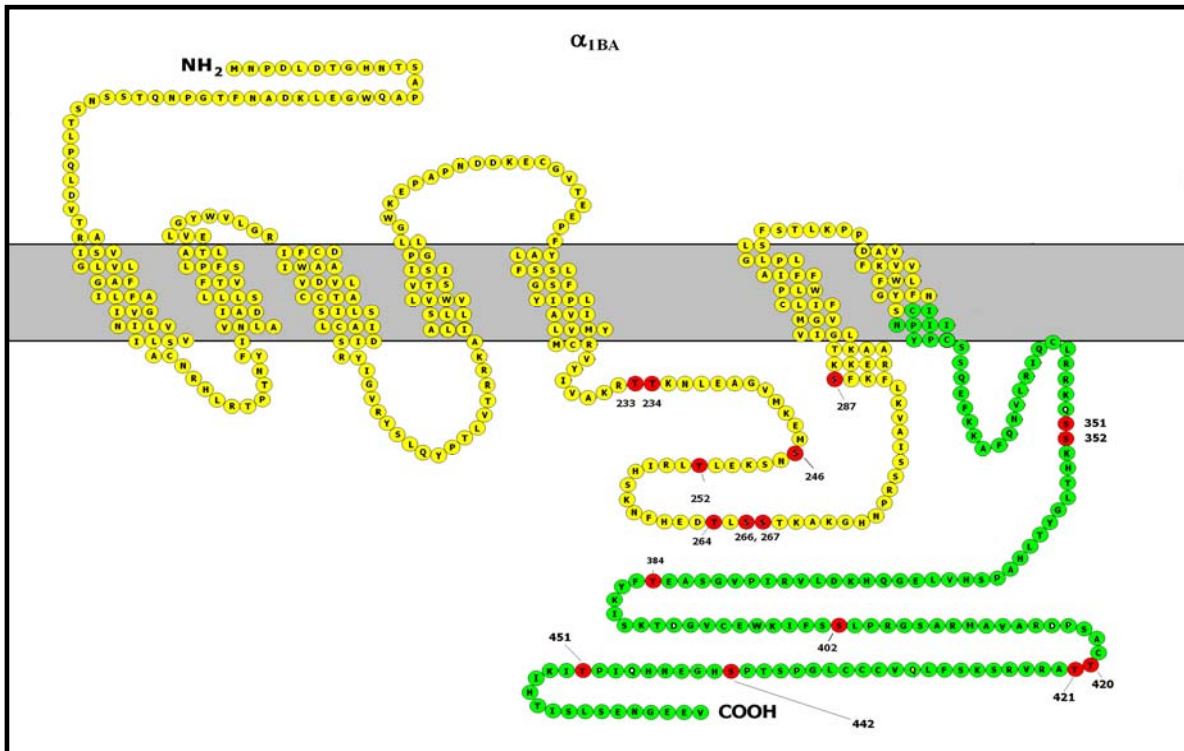


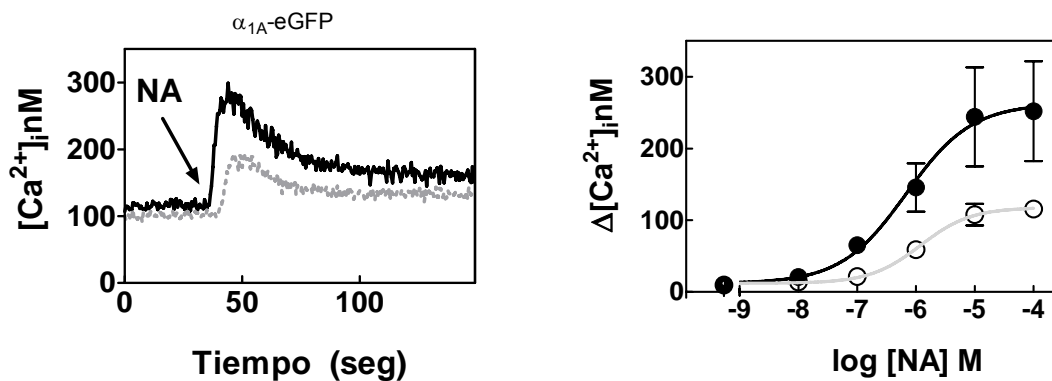
Figura 13. Esquema de los receptores α_{1AB} (panel superior) y α_{1BA} (panel inferior)-quiméricos. Los sitios probables de fosforilación están indicados en rojo.

Con base en los resultados anteriores, se pretendió demostrar el papel funcional, la desensibilización, la internalización y la fosforilación de los sitios importantes del extremo carboxilo en el receptor α_{1A} -adrenérgico.

La estrategia a seguir fue la siguiente: se generaron receptores truncados sin el extremo carboxilo fusionados a la EGFP como se indicó en material y métodos. Estas proteínas de fusión se construyeron por dos motivos: 1. Para observar la internalización de los receptores en la células y 2. para inmunoprecipitarlos con un anticuerpo que va dirigido contra la EGFP que se generó en el laboratorio.

SEÑALIZACIÓN Y DESENSIBILIZACIÓN DE LOS RECEPTORES α_{1A} -ADRENERGICOS

Se evaluó la funcionalidad de los receptores eGFP- $\alpha_{1A}\Delta$ COOH, α_{1A} -eGFP, y $\alpha_{1A}\Delta$ COOH-eGFP, adrenérgicos transfectados establemente en las células HEK293, cuantificando la liberación de calcio intracelular, tras la estimulación con su agonista NA a diferentes concentraciones y realizándoles curvas dosis-respuesta a todos los receptores. Se observó un incremento rápido y transitorio de la concentración de Ca^{2+} intracelular al ser estimulados (Figura 14). De manera interesante, los receptores truncados eGFP- $\alpha_{1A}\Delta$ COOH y $\alpha_{1A}\Delta$ COOH-eGFP mostraron una mayor sensibilidad (línea gris) que el receptor α_{1A} nativo. Inesperadamente el receptor completo fusionado a la EGFP en el extremo carboxilo, mostró una sensibilidad (línea gris) un poco mayor en comparación del receptor WT sin la EGFP (figura 10 A).



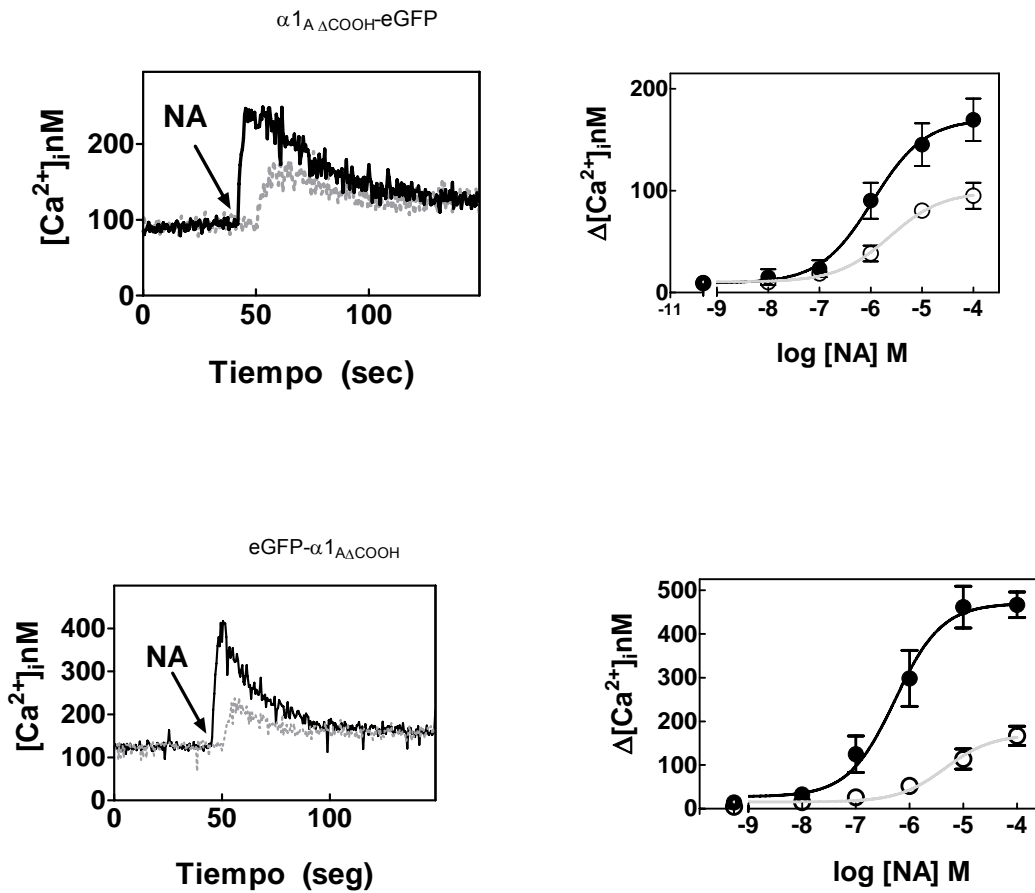


FIGURA 14. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por norepinefrina. Para la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$ las células transfectadas estables con los receptores adrenérgicos, se incubaron con $5\mu\text{M}$ de Fura-2AM por 1hr a 37°C . Paneles izquierdos: Trazo representativo de la respuesta en la $[Ca^{2+}]_i$ promovida por la estimulación de $10\mu\text{M}$ de NE se agrega TPA $1\mu\text{M}$ 5min previos a las estimulación con NE. Paneles derechos: Efecto del TPA sobre la respuesta a NE a diferentes concentraciones en la liberación de $[Ca^{2+}]_i$.

Una vez que comprobamos que los receptores eGFP- $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$, α_{1A} -eGFP, y $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$ -eGFP, adrenérgicos son funcionales, se realizó la caracterización farmacológica, mediante experimentos de unión a ligando de tipo saturante y de competencia, esto se llevó a cabo utilizando $[^3\text{H}]$ tamsulosina, en donde se

observó que los receptores obtienen una K_d que corresponden con lo reportado por García-Sáinz en 1992 (Tabla 1).

INMUNOPRECIPITACION DE LOS RECEPTORES FOSFORILADOS

Los datos de fosforilación mostraron que el receptor completo fusionado a la EGFP en el extremo carboxilo α_{1A} -eGFP, se fosforila en las mismas condiciones que el receptor nativo α_{1A} , aumentando ésta aproximadamente 2.5 veces (Figura 15). Sorprendentemente, los diferentes receptores truncados del extremo carboxilo fusionados uno a la EGFP en el amino eGFP- $\alpha_{1A}\Delta$ COOH, y el otro en el carboxilo $\alpha_{1A}\Delta$ COOH-eGFP, incrementa su fosforilacion aproximadamente 2 veces cuando son estimulados con su agonista NA y con el TPA (Figura 16). Lo anterior nos podría indicar que los sitios de fosforilación en la tercera asa intracelular que se obtuvieron en el análisis *in silico* (figura 16) muy probablemente son los que se están fosforilando.

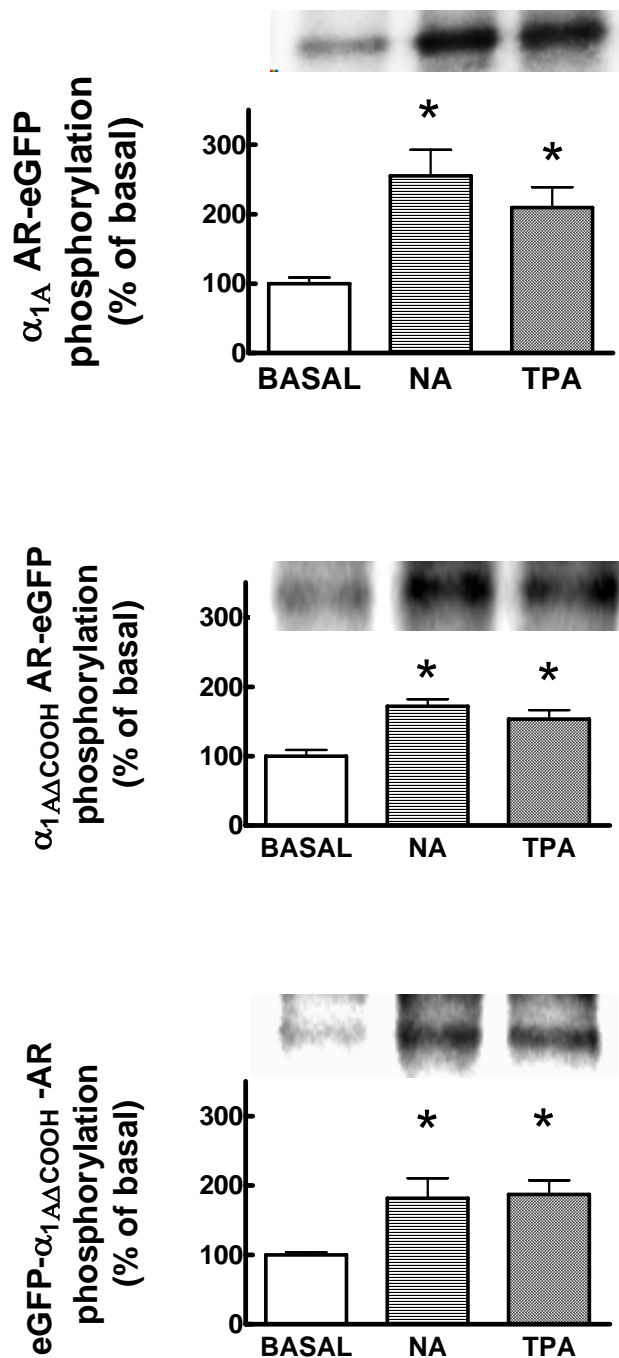


FIGURA 15. Efecto de la NE y TPA sobre la fosforilación de los receptores eGFP- $\alpha_{1\Delta COOH}$, α_{1A} -eGFP, y $\alpha_{1\Delta COOH}$ -eGFP, adrenérgicos.

Las células HEK transfectadas establemente con los receptores fueron marcadas metabólicamente con $150\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P] Pi durante 3 horas a 37°C . Fueron estimulados con $10\mu\text{M}$ de NA durante 5 min y con $1\mu\text{M}$ de TPA durante 15 min.

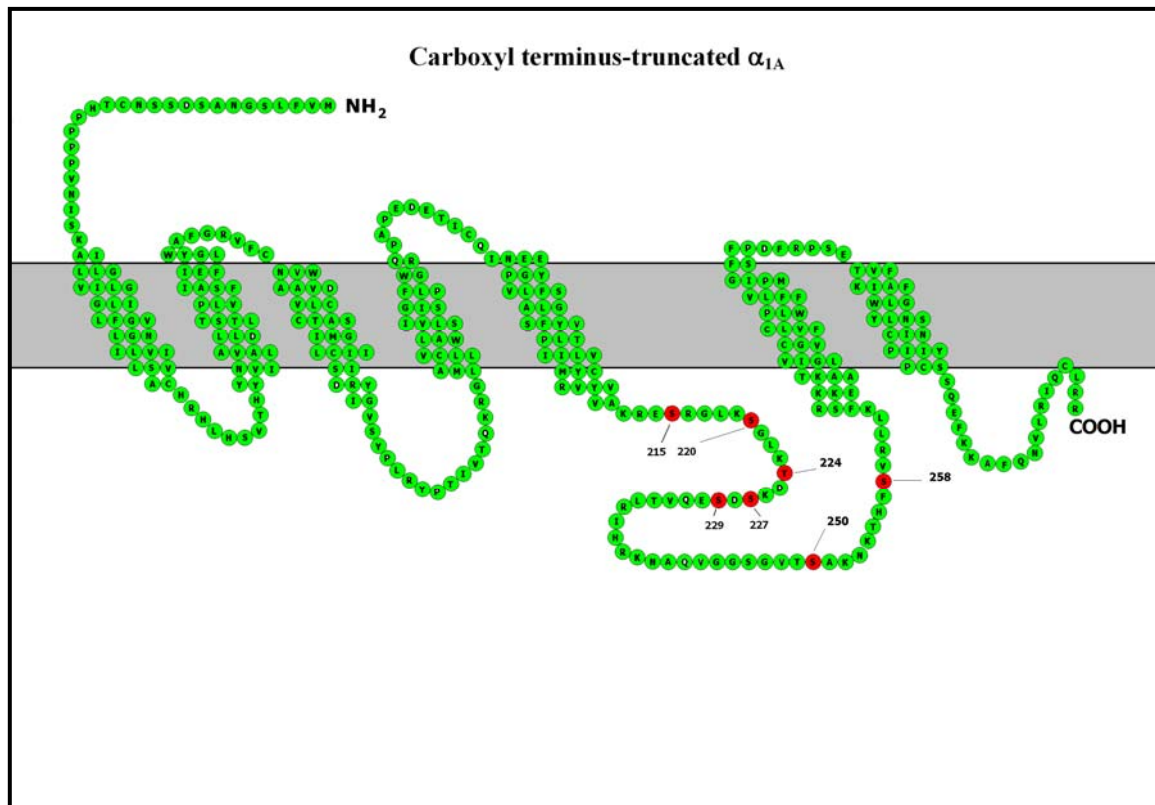


Figura 16. Esquema del receptor α_{1A} -adrenérgico truncado del extremo carboxilo. Los sitios probables de fosforilación están indicados en rojo.

Los datos señalan que los receptores truncados en el extremo carboxilo, transfectados establemente en las células HEK293 son funcionales. En respuesta a la unión con su ligando movilizan calcio, corresponden a la farmacología de los receptores adrenérgicos y siguen presentando un aumento en el nivel de fosforilación tras la estimulación con NA.

Internalización de los receptores eGFP- $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$, α_{1A} -eGFP, y $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$ -eGFP, adrenérgicos

Finalmente probamos si la activación del receptor a través de su ligando o mediante la activación de PKC por TPA, afecta la localización subcelular de los receptores. Para determinar si los receptores se internalizan a consecuencia de su fosforilación, se realizaron estudios de microscopía confocal de los receptores eGFP- $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$, α_{1A} -eGFP, $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$ -eGFP y α_{1B} -eGFP adrenérgicos. Las imágenes de microscopía confocal se realizaron en células HEK293 vivas transfectadas con los diferentes receptores adrenérgicos. Se observó que los receptores se localizaban principalmente en membrana plasmática, ya que al hacer la colocalización con el marcador de membrana se observan de color amarillo (basal). Al estimular durante 5 min con NA y TPA, no se observa la internalización de los receptores, hecho que se corrobora cuando se colocan con el marcador de membrana y la membrana de las células se muestra de color amarillo, lo que nos indica que co-localizan y que el extremo carboxilo del receptor α_{1A} -adrenérgico no participa en el proceso de internalización pero sí en la desensibilización (Figura 17). Lo mismo sucede para el receptor truncado con la EGFP en el extremo carboxilo $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$ -eGFP (Figura 18), y para el receptor truncado con la EGFP en el extremo amino eGFP- $\alpha_{1A}\Delta\text{COOH}$ (Figura 19). Para demostrar que en estas condiciones si se internalizan los receptores, utilizamos al receptor α_{1B} -adrenérgico, ya que ha sido reportado por nuestro grupo y por otros que este receptor se internaliza al estimularlo 5 min con NA y con TPA (figura 20).

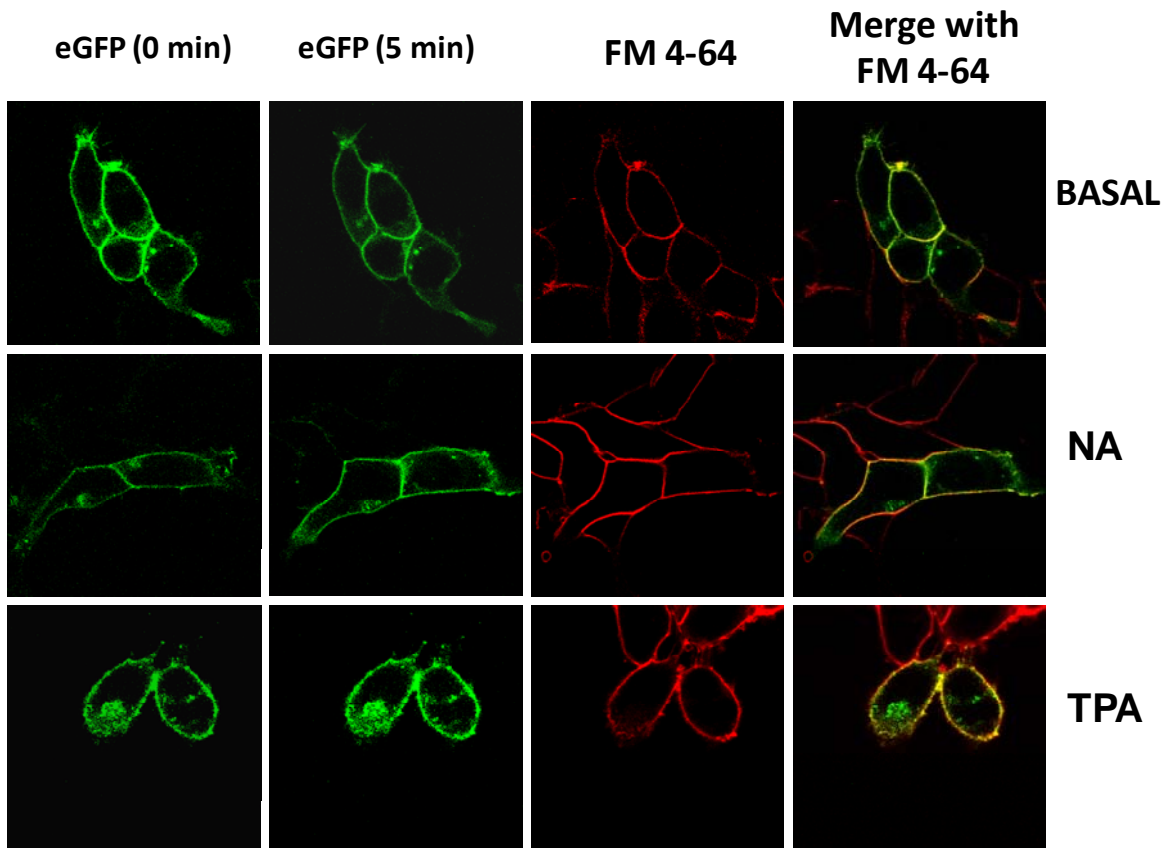


Fig 17. Efecto de NE y TPA en la internalización del receptor α_{1A} -eGFP adrenérgico. Imágenes de las células HEK293 que muestran al receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -EGFP (verde), al tiempo cero (0 min) y a los 5 min de estímulo (5 min), en rojo el marcador de membrana FM 4-64(rojo) colocalizados (merge).

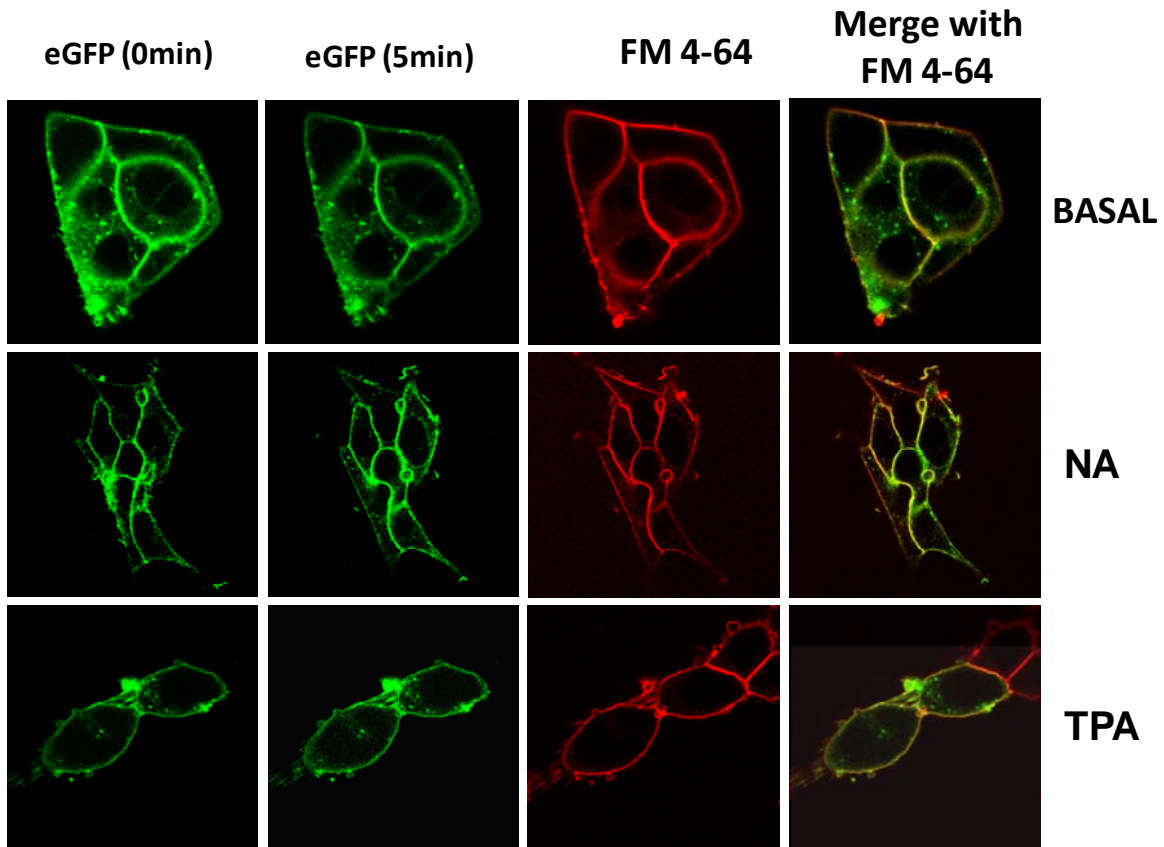


Fig 18. Efecto de NE y TPA en la internalización del receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -eGFP adrenérgico. Imágenes de las células HEK293 que muestran al receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -EGFP (verde), al tiempo cero (0 min) y a los 5 min de estímulo (5 min), en rojo el marcador de membrana FM 4-64(rojo) colocalizados (merge).

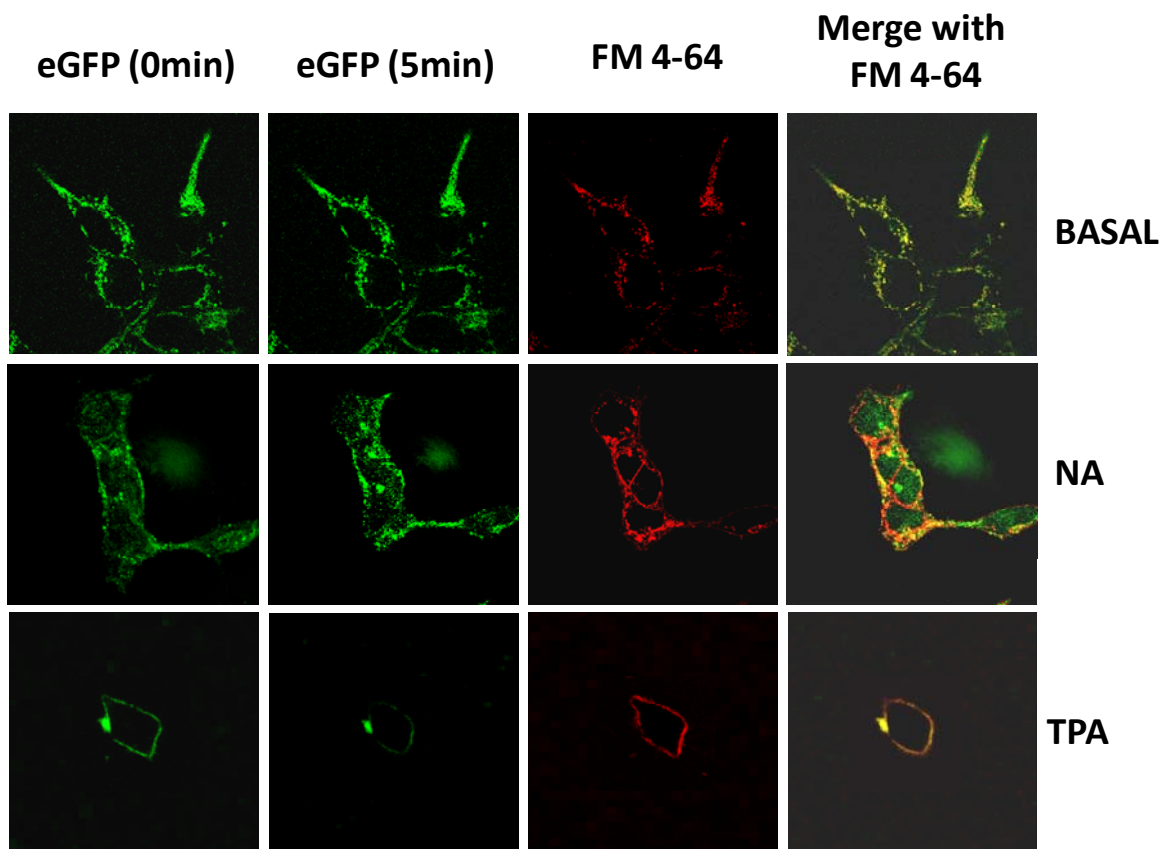


Fig 19. Efecto de NE y TPA en la internalización del receptor eGFP- $\alpha_{1A\Delta COOH}$ adrenérgico. Imágenes de las células HEK293 que muestran al receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -EGFP (verde), al tiempo cero (0 min) y a los 5 min de estímulo (5 min), en rojo el marcador de membrana FM 4-64(rojo) colocalizados (merge).

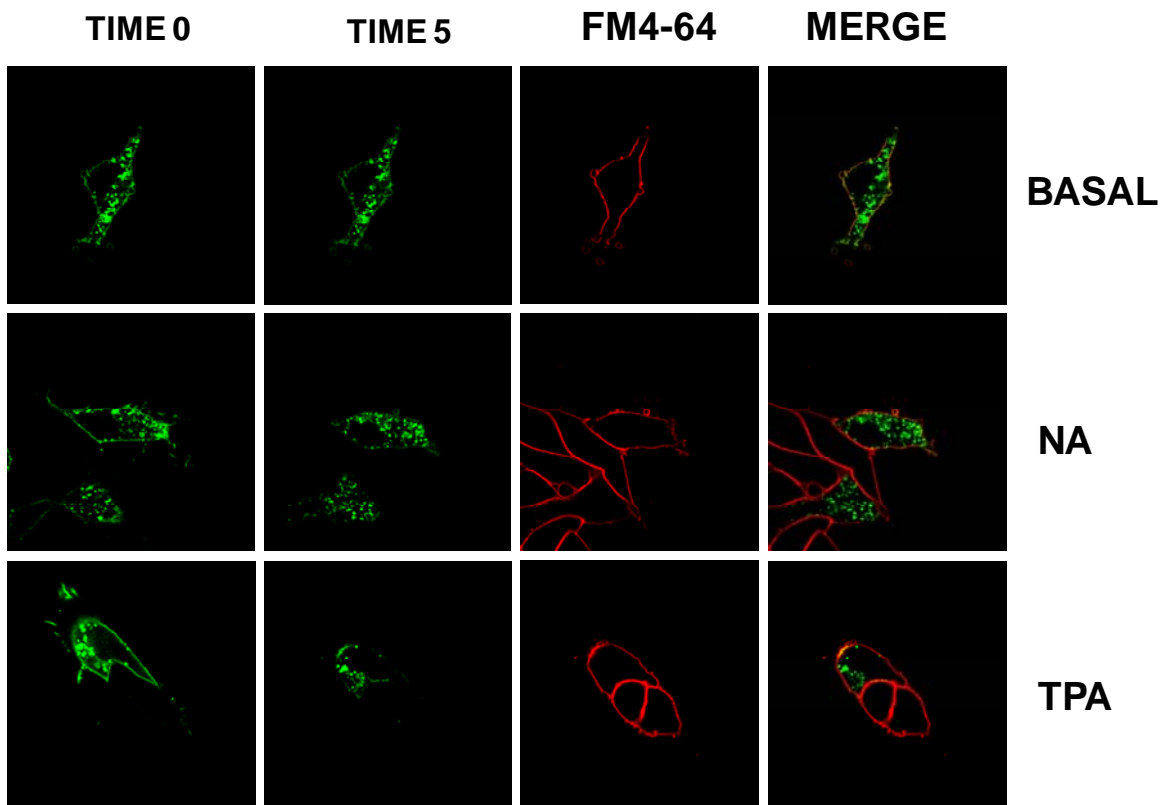


Fig 20. Efecto de NE y TPA en la internalización del receptor α_{1B} -eGFP adrenérgico. Imágenes de las células HEK293 que muestran al receptor $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -EGFP (verde), al tiempo cero (0 min) y a los 5 min de estímulo (5 min), en rojo el marcador de membrana FM 4-64(rojo) colocalizados (merge).

Como una forma de sintetizar los resultados se presenta la siguiente tabla:

RECEPTOR	Desensibilización	Fosforilación inducida por NA	Fosforilación inducida por TPA	Internalización inducida por NA	Internalización inducida por TPA
α_{1A}	+	+	+		
α_{1B}	++++	+++	++++		
α_{1AB}	++	+++	++++		
α_{1BA}	++	+	+		
α_{1A} eGFP	++	++	+	-	-
eGFP $\alpha_{1A\Delta COOH}$	+++	+	+	-	-
$\alpha_{1A\Delta COOH}$ eGFP	++	+	+	-	-

TABLA 3. Fosforilación, desensibilización e internalización de los receptores adrenérgicos.

6. DISCUSION

Nuestro principal interés fue estudiar la relevancia funcional de los sitios de fosforilación del extremo carboxilo de los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos en células HEK, las cuales no expresan endógenamente al receptor y que por lo tanto se consideran un buen modelo de sobreexpresión.

Diferentes trabajos han demostrado que el extremo carboxilo es una estructura muy importante para la función, expresión, señalización, desensibilización, reciclaje, unión a proteínas de membrana y fosforilación de diversos GPCRs (Delhaye et al., 2007; Labasque et al., 2008; Lattion et al., 1994; Pankevych et al., 2003; Schroder et al., 2009), así como también para algunos receptores adrenérgicos (Bouvier et al., 1988; Fredericks et al., 1996) y específicamente para los receptores α_{1A} y α_{1B} AR, los que se ha encontrado que son regulados y fosforilados de forma diferente (Diviani et al., 1997; Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996; Vázquez-Prado et al., 2000). Los sitios de fosforilación del α_{1B} -AR participan en la desensibilización y se encuentran localizados en el extremo carboxilo (Diviani et al., 1997), pero estos mismos sitios no se conservan en el receptor α_{1A} -AR (Price et al., 2002). Realizando un análisis *in silico* de los sitios probables de fosforilación de los receptores α_{1A} y α_{1B} -AR (Tabla 2), se encontró que las secuencias consenso no se conservan entre ambos receptores, en la tercera asa y en el extremo carboxilo.

En las células HEK-293 los receptores son funcionales, inducen la liberación de calcio intracelular, siendo de magnitud mayor la mediada por α_{1A} -AR

que la mediada por el α_{1B} -AR. Estas diferencias se han visto en hepatocitos de diferentes especies (García-Sáinz et al., 1994; García-Sáinz and Romero-Ávila, 1993; García-Sáinz et al., 1992; Gonzalez-Espinosa et al., 1999) y en diferentes tipos celulares cuando son sobreexpresados los receptores, en fibroblastos de rata (RAT-1) (Vázquez-Prado and García-Sáinz, 1996), en células de músculo liso de hamster (DDT-1) (Garcia-Sainz et al., 2004) y en células de riñon de mono (COS-1) (Vázquez-Prado et al., 2000).

Una diferencia interesante en la respuesta a calcio, fue que al unirle al α_{1A} -AR y al α_{1A} -AR truncado la EGFP en el extremo carboxilo, la respuesta disminuyó claramente, en cambio al unirle al α_{1A} -AR truncado la EGFP en el extremo amino, la respuesta en calcio es mucho mayor, aunque para los receptores con la EGFP en el extremo carboxilo hay un mayor número de receptores y la Kd no varió. Lo anterior nos podría indicar que cuando la proteína EGFP está en el extremo amino o en el extremo carboxilo no interfiere con la unión al ligando; pero si pudiera estar interfiriendo en el acoplamiento y activación adecuada de la proteína G con el receptor, reduciendo así la eficacia en la vía de señalización.

Cambios estructurales en los receptores α_1 -adrenérgicos han sido poco estudiados, pero distintos reportes muestran que el cambio de un aminoácido en la zona de unión al ligando, específicamente el intercambio de una cisteína en la posición 128 por fenilalanina en el tercer dominio intracelular para el receptor α_{1B} -adrenérgico, activa constitutivamente al receptor para la señalización a través de la fosfolipasa C (Perez et al., 1996), por otro lado mutaciones en dos fenilalanina

posiciones 163 y 187 para el α_{1A} -adrenérgico afectan la afinidad por el ligando pero no se ve afectada la señalización (Waugh et al., 2000).

Como ya se ha mencionado, un parámetro muy importante para medir la activación de los receptores es la fosforilación de los mismos. Los resultados nos muestran una marcada diferencia en la intensidad de la fosforilación y que esta diferencia concuerda con la sensibilidad por la PKC entre α_{1A} -AR y α_{1B} -AR. Se observó que es mayor la fosforilación para el α_{1B} -AR que para el α_{1A} -AR. También se señaló previamente que los sitios de fosforilación que han sido identificados para el α_{1B} -AR se localizan en el extremo carboxilo (Diviani et al., 1997) y que para el α_{1A} -AR no se ha identificado la localización exacta de estos sitios, lo que nos sugiere que el receptor α_{1A} -AR contiene menos sitios de fosforilación que el α_{1B} -AR; sin embargo un análisis *in silico* (Tabla 2), mostró que el α_{1A} -AR tiene 3 sitios más de fosforilación en el extremo carboxilo (Figura 12 panel superior), que el α_{1B} -AR (Figura 12 panel inferior) y comparando los sitios en la tercera asa intracelular se observó que tienen el mismo número de sitios entre ambos receptores, indicando que los sitios del extremo carboxilo del α_{1B} -AR son más susceptibles a ser fosforilados por la PKC, no descartando que los sitios de la tercera asa intracelular podrían estar participando.

Al intercambiar los extremos carboxilos entre ambos receptores, se obtuvieron datos similares a los reportados por Vázquez-Prado en el 2000 utilizando otro tipo celular (COS-1). Para el caso del receptor quimérico α_{1AB} -AR, se observó una fosforilación similar al α_{1B} -AR cuando se estimuló con NA y con

TPA. Mientras que para el α_{1BA} -AR la fosforilación inducida por NA y TPA disminuyó claramente, comportándose muy parecido al α_{1A} -AR.

Al parecer es en el extremo carboxilo de los receptores α_{1A} y α_{1B} -adrenérgicos es en donde se localizan los sitios importantes para la fosforilación, pero no se conoce si estos sitios son los que están involucrados en el proceso de la desensibilización; ya que ha sido reportado que no en todos los casos los sitios involucrados en la fosforilación están relacionados directamente con la desensibilización (Schroder et al., 2009). Cuando las células se incubaron con el TPA (un activador directo de la PKC), se observó que el α_{1B} -AR es muy sensible a la PKC ya que se desensibiliza casi en su totalidad, mientras que el α_{1A} -AR experimenta una sensibilidad a la PKC muy baja.

Para conocer mas acerca de la función del extremo carboxilo en la desensibilización, se analizó la sensibilidad de los receptores quiméricos a la estimulación mediada por PKC. Lo que se esperaba era que se intercambiara la sensibilidad a la PKC, así como se intercambió la fosforilación entre ambos receptores. Sin embargo, los datos no mostraron lo esperado y lo reportado por diferentes grupos que señalan que la fosforilación conlleva a una desensibilización (Diviani et al., 1997) y que la desensibilización del α_{1A} -AR parece ser independiente del extremo carboxilo (Pierce et al., 2002), ya que el α_{1BA} -AR es mas sensible que el α_{1A} -AR a la acción de la PKC y el α_{1AB} -AR es menos sensible comparándolo con el α_{1B} -AR, lo que nos podría señalar lo siguiente: A) Los sitios de fosforilación del α_{1B} -AR son importantes para la fosforilación y

desensibilización; B) el α_{1B} -AR y el α_{1A} -AR contienen sitios de fosforilación en la tercer asa que pudieran estar involucrados en la desensibilización; C) al intercambiar el extremo carboxilo del α_{1A} -AR se altera su estructura y se exponen otros sitios de fosforilación.

El receptor α_{1A} -AR truncado mostró una mayor sensibilidad a la activación de la PKC en comparación con el receptor completo. Muy interesante resultó que aún sin el extremo carboxilo el α_{1A} -AR se sigue fosforilando con la misma magnitud que el receptor completo. Existe evidencia que algunos GPCRs se desensibilizan en ausencia de la fosforilación (Ferguson, 2007); el mecanismo que ha sido propuesto para distintos receptores como son los de endotelina A y B (Freedman et al., 1997), los muscarínicos (Carman et al., 1999), el receptor tipo A de angiotensina II (Usui et al., 2000), el receptor μ -opioide (Dang et al., 2009), es que la GRK2 secuestra a la proteína $G_{q/11}$ activada, atenuando la señal y desensibilizando así a los receptores de forma independiente de la fosforilación. Los datos nos sugieren que el extremo carboxilo del α_{1A} -AR podría proteger o enmascarar los sitios de fosforilación para PKC en la tercera asa intracelular y que estos sitios sean importantes para la desensibilización.

Los resultados del ensayo de unión a ligando mostraron una alta afinidad para los α_{1A} -AR y α_{1B} -AR, como ha sido reportado en diversos trabajos previos por el laboratorio y en el α_{1A} -AR truncado, lo que nos indicó que al eliminar el extremo carboxilo no disminuyó la afinidad por su ligando. Sin embargo, para el receptor

quimérico α_{1AB} -AR, si disminuyó su afinidad pero esta disminución no afecta la eficacia en la activación del receptor por noradrenalina.

Existe evidencia que la fosforilación lleva a una desensibilización y esta lleva a la internalización de los receptores. Pero también ha sido demostrado que existe diferencia en la internalización entre los receptores α_{1A} -AR y α_{1B} -AR (Chalothorn et al., 2002; Stanasila et al., 2008). Nuestros datos de microscopía confocal mostraron que después de incubar durante 5 min con NA y con TPA, no se detectó la internalización del receptor α_{1A} -AR, sin embargo en la mismas condiciones el α_{1B} -AR mostró una clara internalización.

En el presente trabajo demostramos que el extremo carboxilo del α_{1A} -AR no es esencial para su señalización y fosforilación, que existen otras estructuras como la tercer asa intracelular en donde existen sitios probables de fosforilación y que estos sitios podrían ser importantes para su regulación.

7. CONCLUSIONES

Nuestros datos indican que la activación de la PKC induce la fosforilación y desensibilización de los receptores α_{1AB} -AR, α_{1BA} -AR quiméricos y del receptor α_{1A} -AR truncado, indicando que el extremo carboxilo no es esencial para el proceso de desensibilización, sugiriendo que existen sitios de fosforilación que se podrían encontrar en la tercera asa intracelular. Además, estos resultados también demuestran que el extremo carboxilo del α_{1A} -AR no es indispensable para la internalización.

Roles of the α_{1A} -adrenergic receptor carboxyl tail in protein kinase C-induced phosphorylation and desensitization

Alejandro Cabrera-Wrooman ·
María Teresa Romero-Ávila · J. Adolfo García-Sáinz

Received: 14 January 2010 / Accepted: 23 September 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract Noradrenaline- and tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-induced phosphorylation and functional desensitization of the following receptors were studied: (1) wild-type bovine α_{1A} - and hamster α_{1B} -adrenergic receptors (ARs), (2) chimeric ARs in which the carboxyl terminus tails were exchanged (α_{1AB} - and α_{1BA} -ARs), and (3) carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs fused to enhanced green fluorescent protein. Noradrenaline and TPA pronouncedly increased α_{1B} -AR phosphorylation while TPA markedly desensitized these receptors. In contrast, TPA-induced desensitization and TPA- and noradrenaline-induced phosphorylation of α_{1A} -ARs were clearly of lesser magnitude. Chimeric ARs with exchanged carboxyl terminus tails showed that the extent of phosphorylation reflected the carboxyl domain rather than the receptor core. Surprisingly, there was no correlation between phosphorylation and functional desensitization, i.e., activation of protein kinase C clearly desensitized both chimeric receptors to a similar extent. Interestingly, TPA and noradrenaline increased carboxyl terminus-truncated α_{1A} -AR phosphorylation and TPA also induced receptor desensitization. We were unable to detect carboxyl terminus-truncated α_{1A} -AR internalization after 5-min stimulations with noradrenaline or TPA. Our results suggest the following: (a) the α_{1A} -AR carboxyl terminus tail was not essential for signaling or desensitiza-

tion; (b) carboxyl terminus tail exchange “transplanted” the phosphorylation pattern of the receptors, but the functional consequences of such a transplant were very limited; (c) α_{1A} -AR desensitization was not associated to receptor internalization.

Keywords α_{1A} -Adrenergic receptor · Chimeric receptor · Truncated receptor · Noradrenaline · Desensitization · Receptor phosphorylation

Introduction

α_1 -Adrenergic receptors (α_1 -ARs), a subgroup of the G protein-coupled receptor superfamily, mediate many of the central and peripheral effects of adrenaline and noradrenaline. These ARs are widely distributed throughout organs and tissues and mediate many of the diverse physiological actions of the natural adrenergic amines: adrenaline and noradrenaline. They are also involved in the pathogenesis of diseases. Therefore, the use of agonists and antagonists of these receptors is of cardinal importance in current therapeutics (Hoffman and Lefkowitz 1996; García-Sáinz et al. 1999, 2000; Zhong and Minneman 1999; Piascik and Perez 2001; Tanoue et al. 2003). Three subtypes of α_1 -ARs, i.e., α_{1A} -, α_{1B} -, and α_{1D} -ARs, have been cloned and are encoded by three different genes (Hieble et al. 1995); all subtypes are mainly coupled with $G_{q/11}$ proteins to stimulate phospholipase C activity, IP_3 and diacylglycerol production, and calcium signaling (García-Sáinz et al. 1999, 2000; Zhong and Minneman 1999; Piascik and Perez 2001; Tanoue et al. 2003).

Modulation of AR sensitivity (sensitization/desensitization) is a key element that regulates cell responsiveness to catecholamines, and it is currently accepted that phosphorylation/dephosphorylation cycles participate in such a

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00210-010-0569-7) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Cabrera-Wrooman · M. T. Romero-Ávila ·
J. A. García-Sáinz (✉)
Instituto de Fisiología Celular,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-248,
México 04510, Mexico
e-mail: agarcia@ifc.unam.mx

modulation. In fact, phosphorylation is considered the initial step of the desensitization process (García-Sáinz et al. 2000; Lefkowitz 2004). G protein-coupled receptor phosphorylation frequently occurs at the carboxyl tail (Bouvier et al. 1988; Fredericks et al. 1996; Diviani et al. 1997; Seibold et al. 2000) and at the third intracellular loop (Budd et al. 2001; Trester-Zedlitz et al. 2005; Torrecilla et al. 2007). Receptor phosphorylation increases the binding of β -arrestins, which constitute molecular bridges that associate with clathrin molecules to form vesicles, which in turn lead to receptor internalization via endocytosis (Luttrell and Lefkowitz 2002; Tohgo et al. 2003; Drake et al. 2006). Once inside the cell, receptors could be recycled back to the cell surface or ubiquitin-targeted for degradation (Drake et al. 2006).

The three α_1 -AR subtypes are phosphoproteins whose phosphorylation state is increased when they are stimulated by agonists or by means of direct protein kinase C activation by phorbol esters (Leeb-Lundberg et al. 1985; Lattion et al. 1994; Diviani et al. 1997; Vázquez-Prado et al. 1997, 2000; García-Sáinz et al. 2000, 2001, 2004; Price et al. 2002; Rodríguez-Pérez et al. 2009). However, the sensitivity of α_1 -AR subtypes is different, i.e., α_{1B} and α_{1D} -AR subtypes are more sensitive than α_{1A} -ARs (Vázquez-Prado and García-Sáinz 1996; García-Sáinz et al. 2000; Vázquez-Prado et al. 2000).

Phosphorylation sites are only known for α_{1B} -ARs; they are located at the carboxyl tail (Diviani et al. 1997) and are not conserved in the other subtypes. Interestingly, deletion of the carboxyl tail does not block desensitization of human α_{1A} - (Price et al. 2002) or α_{1D} -ARs (Rodríguez-Pérez et al. 2009), i.e., desensitization appears to be primarily independent of this domain. Studies utilizing chimeric bovine α_{1A} -/hamster α_{1B} -ARs in which the carboxyl tails were exchanged showed that α_{1A} -ARs with the α_{1B} - carboxyl tail (i.e., α_{1AB} -ARs) were phosphorylated to a greater extent than the wild-type α_{1A} -ARs (Vázquez-Prado et al. 2000), but no functional studies were performed. We have further studied these chimeric receptors and an additional carboxyl terminus truncated bovine α_{1A} -AR mutant. Our results showed that α_{1A} -ARs desensitization and phosphorylation can take place in the absence of the carboxyl tail and that there is no clear correlation between the receptor phosphorylation intensity and the extent of desensitization in the chimeric receptors.

Materials and methods

Materials (–)-Noradrenaline, propranolol, tetradecanoyl phorbol acetate (TPA) and protease inhibitors were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) while Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum,

trypsin, and the antibiotics used for cell culture were procured from Life Technologies, Inc (San Diego, CA, USA). Radioactive phosphate ($[^{32}\text{P}]\text{Pi}$) (8500–9120 Ci/mmol) was acquired from New England Nuclear Life Science Products (Wellesley, MA, USA). Sepharose-coupled protein A was obtained from Upstate Biotechnology. Fura-2/AM was acquired from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA) and Lipofectamine 2000, from Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). $[^3\text{H}]$ Tamsulosin (56.3 Ci/mmol) was a generous gift from Yamanouchi Europe (Leiderdorp, The Netherlands).

Chimeric α_{1AB} - and α_{1BA} -ARs cDNAs for wild-type bovine α_{1A} -AR in pBluescript and hamster α_{1B} -AR in pSP65, which contained 5' and 3' non-translated regions, were generous gifts from Dr. Robert Lefkowitz (Duke University). Chimeric α_{1AB} - and α_{1BA} -ARs were constructed by exchanging their carboxyl-terminal tails. A conserved *PvuII* site located in the seventh transmembrane segment of both cDNAs coding sequences was used for fragment ligation. cDNAs in the original plasmids were digested with *EcoRI*-*PvuII* and the α_{1A} -AR 5'-cDNA was ligated into the 3'-cDNA of the α_{1B} -AR and vice versa. Non-coding sequences were eliminated as described previously in detail, and cDNAs were cloned into pCDNA3 for expression (Vázquez-Prado et al. 2000).

Wild-type and carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs tagged with enhanced green fluorescent protein Receptors were tagged with the enhanced green fluorescent protein (eGFP) either at the carboxyl (AR-eGFP) or amino (eGFP-AR) termini. To tag the receptors at the carboxyl terminus the full-length α_{1A} -AR cDNA in pCDNA3.1 vector was digested with *EcoRI*-*NotI*, the product was amplified by polymerase chain reaction, generating restriction sites and eliminating the stop codon. The following oligonucleotides were used: (a) for both wild type and carboxyl terminus-truncated receptors 5'-GCCGAATTCGATGGTGTCTTCTCTCCGAAAT-3' (sense) corresponding to bases 1–22 of the bovine α_{1A} -AR protein coding sequence, with an additional *EcoRI* site; (b) for wild-type receptor 5'-AGTGAAAATGGGGAGGAAGTCAGG GATCCAAA3' (antisense) corresponding to bases 1378–1398 of the coding sequence with an additional *BamHI* site; for construction of carboxyl terminus-truncated α_{1A} -AR, 5'-AATCCAGTGTCTGCGACGAAGGGATCCAAA-3' (antisense) corresponding to bases 1025–1045 of the coding with an additional *BamHI* site (this eliminated the last 118 amino acids of the carboxyl tail). The amplified fragments were digested with *EcoRI* and *BamHI* and ligated into the pEGFP-N1 vector (Clontech), to generate a receptor tagged at the carboxy-terminus with eGFP. Plasmid nucleotide sequences were verified by double-stranded DNA sequencing performed at our Institute's Molecular Biology Unit.

For carboxyl terminus-truncated eGFP-tagged α_{1A} -AR construction, the last 118 amino acids of the carboxyl tail were eliminated. cDNA in the pCDNA3.1 vector was digested with EcoRI-NotI, and the product was amplified by polymerase chain reaction, generating restriction sites and two stop codons. The following oligonucleotides were used: 5'-CCGCTCGAGCCACCATGGTGTCTCTCCG GAAATG-3' (sense) which correspond to bases 1–22 of the bovine α_{1A} -AR coding sequence with an additional XhoI site; and 5'-CTAGTCTAGACTATTATCGTCGCA GAACTGGATTC-3' (antisense) which correspond to bases 1024–1044 of coding sequence with two stop codons and an additional XbaI site. The amplified fragment (1,044 bp) was digested with XhoI and XbaI and ligated into the pCEFLP vector (generously provided to us by Dr. José Vázquez-Prado CINVESTAV, Mexico). Plasmid nucleotide sequences were verified by double-stranded DNA sequencing performed at our Institute's Molecular Biology Unit. Schematic representations of wild-type, carboxyl terminus-swapped, and truncated receptors are presented as supplementary material (supplementary fig. S1). The α_{1B} -AR construction tagged at the carboxyl terminus with the eGFP was described previously (Molina-Muñoz et al. 2008).

Cell lines and culture HEK 293 cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were transfected with these plasmids utilizing Lipofectamine 2000 following the manufacturer's instructions and were cultured for stable receptor expression in a selection media containing: glutamine-containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 600 μ g/ml of the neomycin analog, G-418 sulfate, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 0.25 μ g/ml amphotericin B at 37°C under a 95% air/5% CO₂ atmosphere. Several clones were isolated and were screened for adrenergic responsiveness (noradrenaline-induced increase in intracellular calcium concentration). HEK 293 cells have a small β -adrenergic responsiveness; therefore, all experiments were performed in the presence of 1 μ M propranolol. Clones with robust responses and high receptor densities were selected for this study and further cultured in the media described above, but with reduced G-418 (300 μ g/ml). In all experiments, confluent cells were serum-deprived overnight in unsupplemented Dulbecco's modified Eagle's medium. In spite of the selection media, some of the cells did not express the receptors as was evidenced in the confocal images and expression of eGFP tagged receptors decreased with passaging.

Radioligand binding studies Membranes were prepared and radioligand binding studies were performed essentially as described (Vázquez-Prado et al. 1997, 2000). In brief,

binding studies were carried out by incubating the radioligand (0.02–6 nM) with membranes (10–50 μ g of membrane protein) in a final volume of 0.25 ml for 60 min at 30°C in a water bath shaker. Incubation was terminated by the addition of 5 ml of ice-cold buffer and filtration through GF/C filters using a Brandel harvester (Gaithersburg, MD, USA). Filters were washed twice and dried, and radioactivity was measured in a liquid scintillation counter. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μ M phentolamine; specific binding was >90% of total binding at the K_D .

[Ca²⁺]_i measurements Confluent HEK 293 cells were incubated overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium without serum and antibiotics. Cells were loaded with 5 μ M Fura-2/AM in Krebs-Ringer Hepes containing 0.05% bovine serum albumin, pH 7.4, for 1 h at 37°C. Cells were detached by gentle trypsinization. Experiments were performed with $\approx 10^6$ cells suspended in 3 ml of the previously mentioned buffer supplemented with 1.2 mM CaCl₂. Fluorescence measurements were conducted with an Aminco-Bowman Series two spectrometer (Rochester, NY, USA) with the excitation monochromator set at 340 and 380 nm, with a chopper interval of 0.5 s, and with the emission monochromator set at 510 nm. [Ca²⁺]_i was calculated according to (Grynkiewicz et al. 1985) employing the software provided by Aminco Bowman; traces were directly exported to the graphs.

Phosphorylation of adrenergic receptors HEK 293 cells, expressing bovine α_{1A} -ARs, hamster α_{1B} ARs, chimeric α_{1AB} -ARs or α_{1BA} -ARs, or carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs were cultured as described previously. Cells reaching confluence were serum-starved for 24 h and then maintained in phosphate-free Dulbecco's modified Eagle's medium for 1 h and then incubated in 1 ml of the same medium containing [³²P]Pi (50 or 150 μ Ci/ml, as indicated) for 3–5 h at 37°C, as previously described (Vázquez-Prado et al. 2000). Labeled cells were stimulated as indicated and at the end of the incubation were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and solubilized with 1.0 ml of ice-cold buffer containing the following: 100 mM NaCl, Tris 10 mM, Triton X-100 0.1%, Nonidet P40 0.1%, 10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM β -glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM p-serine, 1 mM p-threonine, and 1 mM p-tyrosine. The plates were maintained on ice for 1 h. The extracts were centrifuged at 12,700 \times g for 15 min at 4°C, and the supernatants were collected. Receptors were immunoprecipitated using rabbit antibodies generated in our laboratory and directed against the carboxyl terminus of α_{1A} -ARs (Vázquez-Prado et al. 2000), α_{1B} -ARs (Vázquez-Prado et al. 1997, 2000), or the enhanced GFP (Avendaño-Vázquez et al. 2005) as described. Receptor phosphorylation

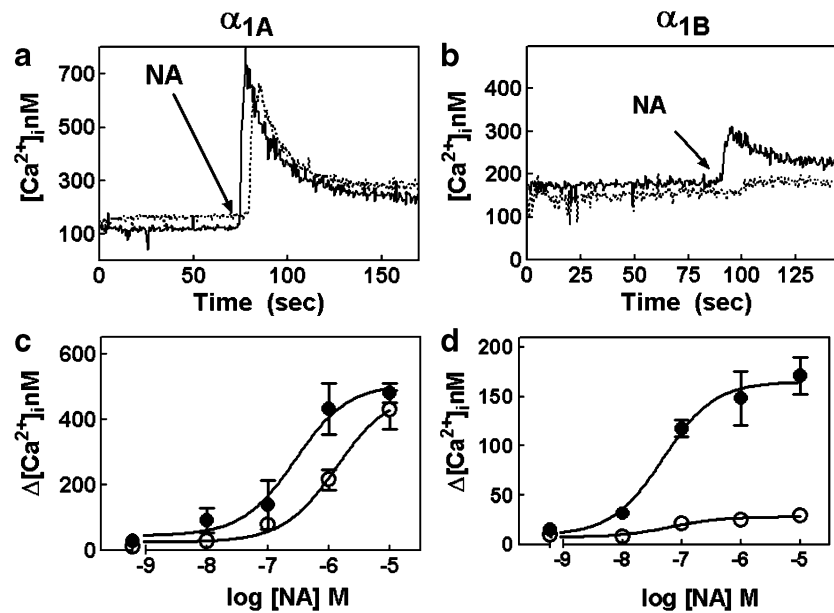


Fig. 1 Effect of TPA on noradrenaline-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cells expressing wild-type α_{1A} - and α_{1B} -ARs. HEK 293 cells expressing α_{1A} -ARs (**a**, **c**) or α_{1B} -ARs (**b**, **d**) were loaded with Fura-2/AM and changes in intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) recorded. *Upper panels* are representative tracings of cells preincubated in the absence (*solid lines*) or presence (*dotted gray lines*) of 1 μ M TPA for 5 min. Addition of noradrenaline (NA) 10 μ M is

indicated with an *arrow*. *Lower panels* Concentration–response curves to NA of cells preincubated for 5 min in the absence (*solid circles*) or presence (*open circles*) of 1 μ M TPA. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Errors are contained within the symbol where no vertical lines are shown

was detected with a Molecular Dynamics PhosphorImager and quantified with ImageQuant software (Amersham Biosciences Inc., Sunnyvale, CA, USA). Data fell within the apparatus' linear detection range and were plotted utilizing Prism 4.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Confocal microscopy Confocal images were obtained using an Olympus Fluoview FV 1,000 spectral laser scanning system (Olympus, Corporation, Tokyo, Japan) attached/interfaced to an OLYMPUS IX81 inverted light

Table 1 Binding parameters derived from saturation isotherms using [3 H]tamsulosin

Receptor	K_D (pM)	B_{max} (fmol/mg protein)
Wild-type α_{1A} -AR	26 \pm 2	285 \pm 91
Wild-type α_{1B} -AR	500 \pm 90	1195 \pm 275
α_{1AB} -AR chimera	510 \pm 30	689 \pm 275
α_{1BA} -AR chimera	450 \pm 30	415 \pm 125
α_{1A} -AR-eGFP	130 \pm 15	440 \pm 140
$\alpha_{1A\Delta COOH}$ -AR-eGFP	60 \pm 12	850 \pm 100
eGFP- $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -AR	50 \pm 10	155 \pm 50

Membranes were obtained from HEK 293 cells that expressed the indicated receptors. Results are the means \pm SEM of 3–5 determinations using different membrane preparations

$\Delta COOH$ carboxyl-truncated, *eGFP* enhanced green fluorescent protein

microscope with a 60 \times N.A. 1.35 oil-immersion objective. Enhanced GFP was excited employing the 488 nm line of an Argon laser and the emitted fluorescence was detected with a 500–530 nm spectral setting. FM4-64 was excited utilizing the 543 nm line of a He–Ne gas laser and the emitted fluorescence detected with a 555–655 nm spectral setting in the diffraction grid. All images were obtained with the same laser power percentage, confocal aperture, and gain. Operating the laser at a low power setting (95–99% AOTF attenuation) substantially reduced photobleaching and damage. Confocal images were viewed, processed, and converted to TIFF format with the FV10-ASW software (Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Assays were made with cells growing on tissue culture dishes (35 mm) with glass bottom plates (0.17 mm). When noradrenaline or TPA was added, the solution was pipetted directly into the dishes while images were continuously recorded.

Statistical analysis

All data were analyzed and plotted by using GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical analysis between comparable groups was performed utilizing ANOVA with Bonferroni's post-test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant as mentioned in the figure legends.

Results

Functional effects of TPA on α_{1A} and α_{1B} -ARs As indicated, previous studies using rat-1 fibroblasts expressing α_{1A} and α_{1B} -ARs showed differences in activity, i.e., α_{1A} -AR activation induced a larger response than α_{1B} -ARs, at similar receptor densities; we also observed clear differences in sensitivity to active phorbol esters, such as TPA, i.e. α_{1A} -ARs were less sensitive to protein kinase C action than α_{1B} -ARs

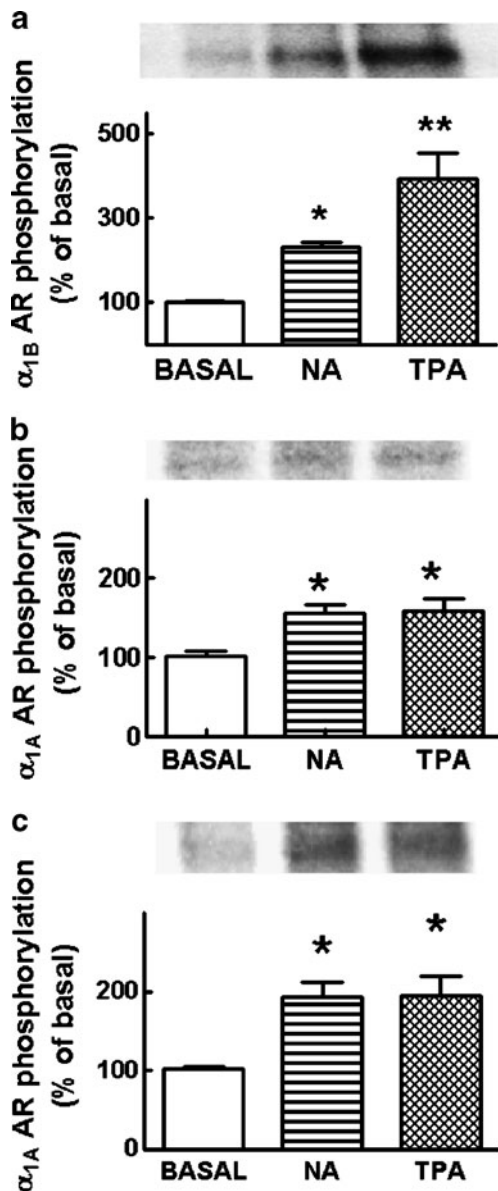


Fig. 2 Effects of noradrenaline and TPA on wild-type α_{1A} - and α_{1B} -ARs phosphorylation. Cells expressing wild-type α_{1B} -ARs (a) or α_{1A} -ARs (b, c) were metabolically labeled with 50 $\mu\text{Ci/ml}$ (a, b) or 150 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]P_i and incubated in the absence of any agent (Basal), 10 μM noradrenaline (NA) for 5 min, or 1 μM (TPA) for 15 min. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. * $p < 0.05$ vs. Basal; ** $p < 0.001$ vs. Basal

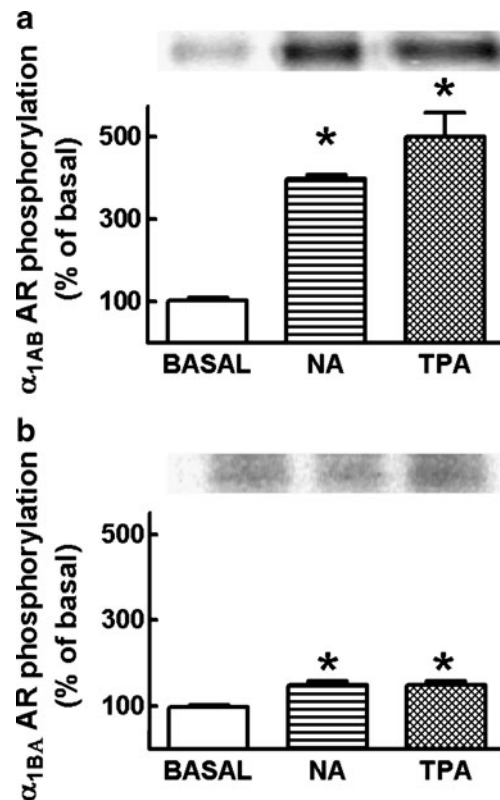


Fig. 3 Effects of norepinephrine and TPA on chimeric α_{1AB} and α_{1BA} -ARs phosphorylation. Cells expressing chimeric α_{1AB} - (a) or α_{1BA} -ARs (b) were metabolically labeled with 50 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]P_i and incubated in the absence of any agent (Basal), 10 μM noradrenaline (NA) for 5 min, or 1 μM (TPA) for 15 min. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. * $p < 0.001$ vs. Basal; ** $p < 0.01$ vs. Basal

(Vázquez-Prado and García-Sáinz 1996; Vázquez-Prado et al. 2000). In the studies presented herein and utilizing HEK 293 cells expressing these receptors, we consistently observed differential responsiveness and sensitivity patterns to protein kinase C activation. As depicted in Fig. 1, 10 μM noradrenaline induced a marked (5- to 6-fold) increase in intracellular calcium concentration α_{1A} -AR-expressing cells whereas in cells expressing the α_{1B} subtype the response was consistently smaller (≈ 2 -fold increase). It is noteworthy that α_{1B} -AR expressing cells had a higher receptor density than those expressing the α_{1A} subtype (Table 1); as expected (García-Sáinz et al. 1995) α_{1A} -ARs exhibited higher affinity for tamsulosin than α_{1B} -ARs (Table 1).

The effects of TPA on α_{1A} - and α_{1B} -AR mediated increases in intracellular calcium were subsequently evaluated. It was observed that in α_{1A} -ARs-expressing cells, preincubation for 5 min with TPA slightly reduced the response to 10 μM noradrenaline; this was also evidenced by a relative small (≈ 6 -fold) shift to the right in the concentration-response curve for the adrenergic agonist. In

α_{1B} -AR-expressing cells TPA essentially abolished the response to noradrenaline (Fig. 1).

Noradrenaline- and TPA-induced α_{1A} - and α_{1B} -ARs phosphorylation Time-course and concentration-response studies indicated that the maximum noradrenaline effect was observed at a concentration of 10 μ M and at 5 min of incubation whereas that of TPA occurred at 1 μ M and at 15 min (data not shown). Therefore, these conditions were employed in all subsequent phosphorylation studies. It was observed that both 10 μ M noradrenaline and 1 μ M TPA increased α_{1B} -AR phosphorylation (\approx 2.5- and \approx 4.5-fold, respectively; Fig. 2). α_{1A} -AR phosphorylation was difficult to study, and we were required to use a higher amount of radioactive phosphate during the cell preincubation to evidence the effect clearly. Nevertheless, under both conditions (50 and 150 μ Ci/ml [32 P]Pi) 10 μ M noradrenaline and 1 μ M TPA increased \approx 2-fold receptor labeling in α_{1A} -AR-expressing cells (Fig. 2).

Phosphorylation of α_{1AB} and α_{1BA} -ARs and functional consequences HEK 293 cell lines that expressed chimeric α_{1AB} -ARs or α_{1BA} -ARs were obtained and it was observed that both lines possessed similar receptor densities (Table 1). But surprisingly, the affinity for tamsulosin was also very similar, indistinguishable from that of α_{1B} -ARs (Table 1), i.e., a clear decrease in affinity for this antagonist was observed

in receptors containing α_{1A} -ARs core structure, with only the intracellular carboxyl tail changed.

We studied receptor phosphorylation using a low amount of radioactive phosphate (50 μ Ci/ml) during the preincubation. As shown in Fig. 3, receptor phosphorylation was strong and easily detected in α_{1AB} -AR chimera-expressing cells. In these cells, incubation with 10 μ M noradrenaline or 1 μ M TPA resulted in clear (4- to 6-fold) increases in receptor phosphorylation. In contrast, α_{1BA} -AR chimera phosphorylation was much weaker and only small (\approx 1.5–2-fold) increases in receptor phosphorylation were induced by cell incubation with 10 μ M noradrenaline or 1 μ M TPA (Fig. 3).

Cellular response to noradrenaline (an increase in intracellular calcium concentration) was similar in cells expressing either of the two chimeric receptors (Fig. 4), i.e., 10 μ M noradrenaline induced a 3- to 4-fold increase in intracellular calcium in α_{1AB} -AR-expressing cells and a 2- to 3-fold increase in cells expressing the α_{1BA} -AR chimera (Fig. 4). Preincubation with 1 μ M TPA attenuated, in both cell lines, noradrenaline-induced increases in intracellular calcium markedly decreasing the maximum in the concentration-response curves to the natural catecholamine (Fig. 4).

Effects of TPA on carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs In order to investigate the role of the α_{1A} -AR carboxyl tail,

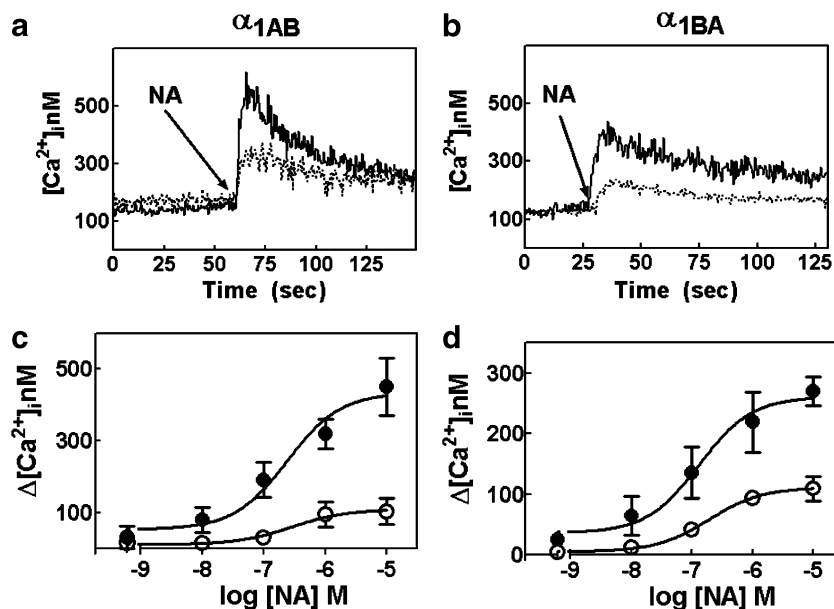


Fig. 4 Effect of TPA on noradrenaline-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cells expressing chimeric α_{1AB} - and α_{1BA} -ARs. HEK 293 cells expressing α_{1AB} -ARs (a, c) or α_{1BA} -ARs (b, d) were loaded with Fura-2/AM and changes in intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) recorded. *Upper panels* are representative tracings of cells preincubated in the absence (solid lines) or presence (dotted line) of 1 μ M TPA for 5 min. Addition of noradrenaline (NA) 10 μ M is indicated

with an arrow. *Lower panels* Concentration–response curves to NA of cells preincubated for 5 min in the absence (solid circles) or presence (open circles) of 1 μ M TPA. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Errors are contained within the symbol where no vertical lines are shown

truncated mutants were constructed, expressed in HEK 293 cells, and lines that expressed the receptor were isolated. We included in the constructions the eGFP for two reasons: (a) in order to be able to immunoprecipitate the receptor with an anti-GFP antibody (Avenidaño-Vázquez et al. 2005) and (b) to visualize the construction using fluorescent confocal microscopy.

Control experiments in which non-tagged eGFP was expressed were also carried out. As shown in Supplementary Fig. S2, this protein was strongly expressed in cell cytoplasm and nucleus but not at the plasma membrane level. As anticipated, treatment of these cells with noradrenaline did not induce any increase in intracellular calcium (data not shown).

Similarly, no change in eGFP cellular location was observed when 10 μ M noradrenaline or 1 μ M TPA were added to the cells for times up to 15 min (Supplementary Fig. S2).

Expression of complete and carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus was reasonably abundant in both cases and the receptors exhibited high affinity for tamsulosin. Expression of carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs tagged at the amino terminus with the eGFP was not abundant but the receptor exhibited a very high affinity for tamsulosin, indistinguishable from that of wild-type α_{1A} -ARs (Table 1). Efforts to express the complete α_{1A} -AR tagged at the amino terminus with eGFP were unsuccessful.

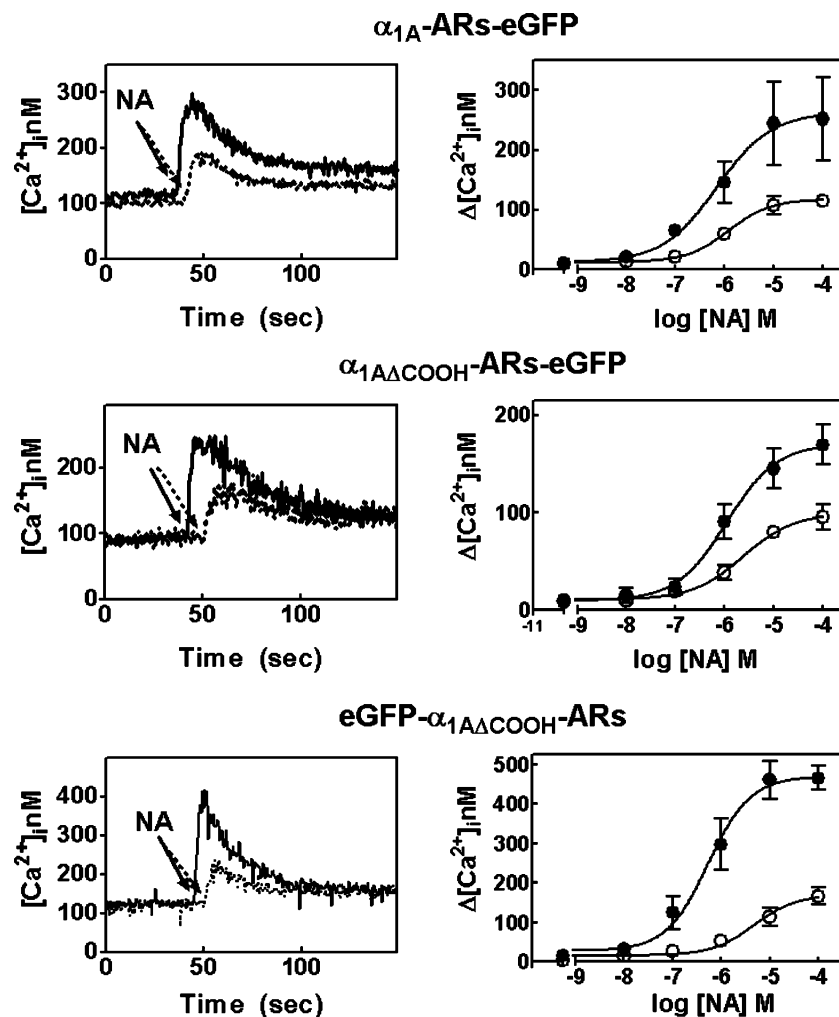


Fig. 5 Effect of TPA on noradrenaline-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase in cells expressing complete or carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs. HEK 293 cells expressing α_{1A} -AR constructions were loaded with Fura-2/AM and changes in intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) recorded. *Upper panel* cells expressing complete α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus (α_{1A} -ARs-eGFP). *Middle panel* cells expressing carboxyl-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus ($\alpha_{1A\Delta COOH}$ -ARs-eGFP). *Lower panel* cell expressing carboxyl-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the amino terminus

(eGFP- $\alpha_{1A\Delta COOH}$ -ARs). *Left figures* representative tracings of cells preincubated in the absence (*solid line*) or presence (*dotted line*) of 1 μ M TPA for 5 min. Addition of NA 10 μ M is indicated with an arrow. *Right figures* concentration–response curves to NA of cells preincubated for 5 min in the absence (*solid circles*) or presence (*open circles*) of 1 μ M TPA. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Errors are contained within the symbol where no vertical lines are shown

Noradrenaline (10 μM) induced a medium (≈ 2 - to 3-fold) increase in intracellular calcium in cells expressing complete or carboxyl-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus (Fig. 5 upper and middle panels); preincubation with TPA (1 μM) for 5 min reduced the intracellular calcium increase induced by different concentrations of noradrenaline in these cells (Fig. 5, upper and middle panels). When cells expressing the amino terminus-tagged carboxyl terminus-truncated α_{1A} -AR mutant were stimulated with 10 μM noradrenaline, a robust (4- to 5-fold) increase in intracellular calcium was observed (Fig. 5 lower panels). Interestingly, preincubation with 1 μM TPA for 5 min markedly decreased the effect of noradrenaline (Fig. 5, lower panel). Concentration–response curves confirmed this pattern, i.e., TPA markedly decreased the maximal response to noradrenaline (Fig. 5, lower right panel).

Our next step was to investigate whether TPA was able to induce phosphorylation of these eGFP-tagged α_{1A} -AR mutants, and this did indeed take place. Cell incubation with 10 μM noradrenaline or 1 μM TPA resulted in an increased phosphorylation (≈ 2 -fold) of these receptors (Fig. 6). Control experiments using cells expressing non-tagged eGFP showed that no phosphorylation of this protein was observed either in basal or stimulated (noradrenaline or TPA) conditions.

Subcellular localization of carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs We explored whether noradrenaline or protein kinase C activation by TPA could affect receptor location. Images showed that completed or carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs (fused at the amino or carboxyl terminus with the eGFP) were mainly present at the plasma membrane (Figs. 7 and 8) and that cell incubation for 5 min with 10 μM noradrenaline or 1 μM TPA did not induced any noticeable internalization of these receptors (Fig. 7). At the end of incubation, the plasma membrane marker FM4-64 (red) was added and fluorescence co-localization (yellow) was evidenced in the merged images. In contrast and as shown in Fig. 8, lower panel, complete α_{1B} -ARs (fused at the carboxyl terminus with the eGFP) internalized in response to these stimuli as evidenced by an increase in intracellular vesicles and markedly decreased membrane localization.

Discussion

The present work continues the effort of different groups to clarify the role(s) of the carboxyl terminus of G protein-coupled receptors. In some receptors this domain appears to be a crucial region for various aspects of their function,

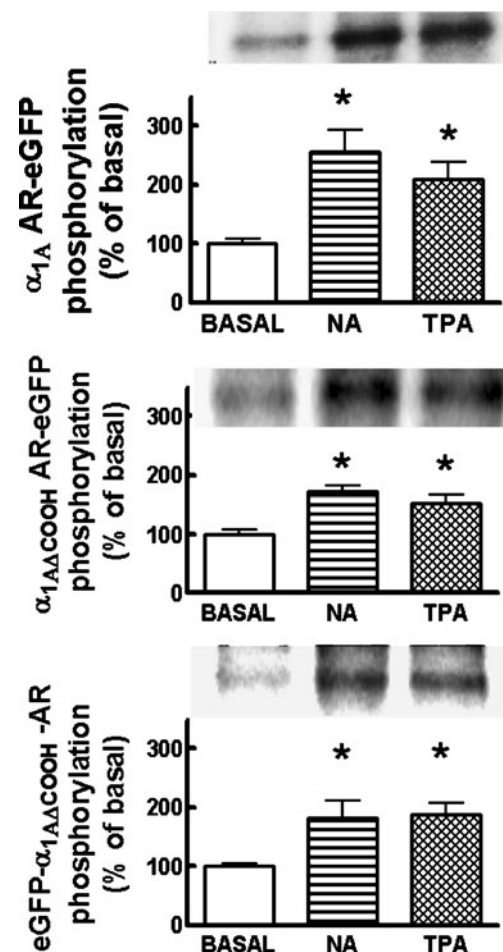
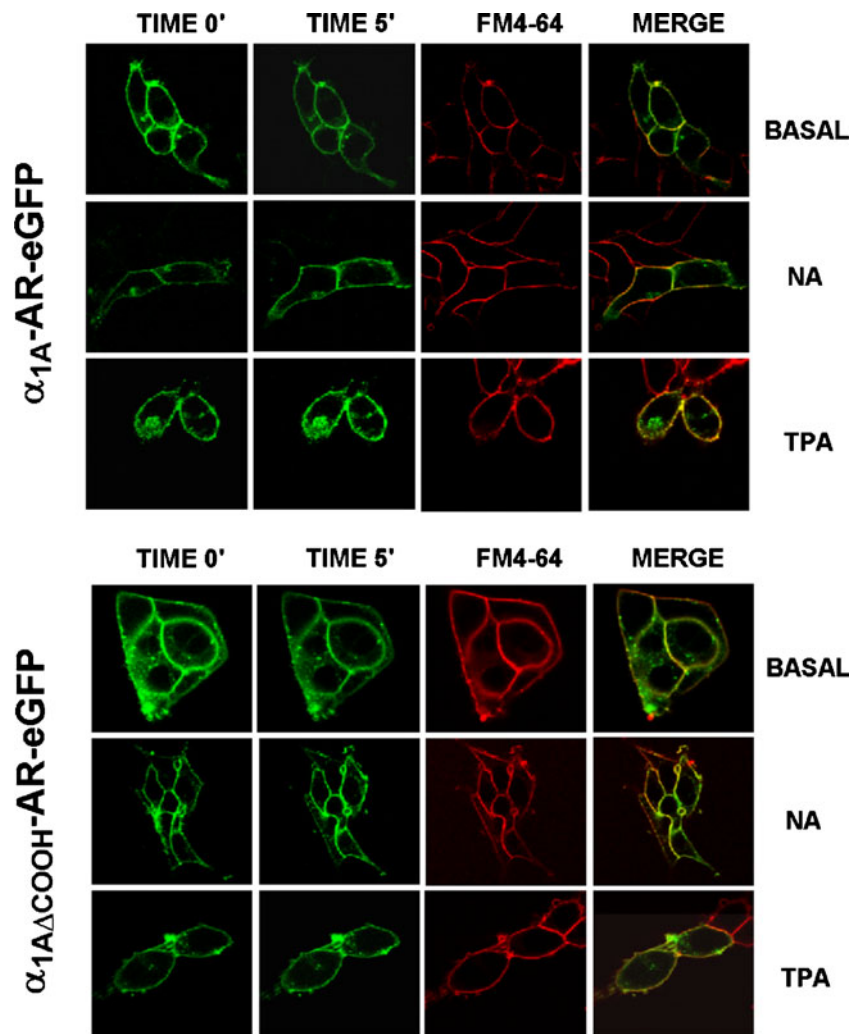


Fig. 6 Effects of norepinephrine and TPA on carboxyl terminus-truncated α_{1A} -AR phosphorylation. *Upper panel* cells expressing complete α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus (α_{1A} -ARs-eGFP). *Middle panel* cells expressing carboxyl-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the carboxyl terminus ($\alpha_{1A\Delta\text{COOH}}$ -ARs-eGFP). *Lower panel* cell expressing carboxyl-truncated α_{1A} -ARs eGFP-tagged at the amino terminus (eGFP- $\alpha_{1A\Delta\text{COOH}}$ -ARs). Cells were metabolically labeled with 150 $\mu\text{Ci/ml}$ [^{32}P]P $_i$ and incubated in the absence of any agent (Basal), 10 μM NA for 5 min, or 1 μM (TPA) for 15 min. Plotted are the means and vertical lines are representing the SEM of data from three to four experiments using different cell preparations. Representative autoradiographs are presented. * $p < 0.05$ vs. Basal

such as expression, signaling, desensitization, recycling, and binding to regulatory proteins (Lattion et al. 1994; Diviani et al. 1997; Pankevych et al. 2003; Delhayé et al. 2007; Labasque et al. 2008; Schroder et al. 2009). As already mentioned, it has been shown that for hamster α_{1B} -ARs, the phosphorylation sites involved in desensitization are located at the carboxyl terminus (Lattion et al. 1994; Diviani et al. 1997). These sites are not conserved in the other α_1 -AR subtypes and, in fact, evidence indicates that carboxyl terminus-truncated human α_{1A} - (Price et al. 2002) and human α_{1D} -ARs (Rodríguez-Pérez et al. 2009) can signal properly and be regulated by phosphorylation. Our present work confirms the findings made for human

Fig. 7 Confocal images of HEK 293 cells expressing complete and carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs fused at the carboxyl terminus with enhanced GFP. *Upper panel* complete α_{1A} -ARs. *Lower panel* carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs. Cells were treated for 5 min with vehicle (BASAL), 10 μ M noradrenaline (NA) or 1 μ M TPA; at the end of incubation FM4-64 (membrane marker, red) was added and fluorescence recorded. *Right column* merge images are presented, colocalization is evidenced in yellow



α_{1A} -ARs (Price et al. 2002) and presents further advances using the bovine ortholog.

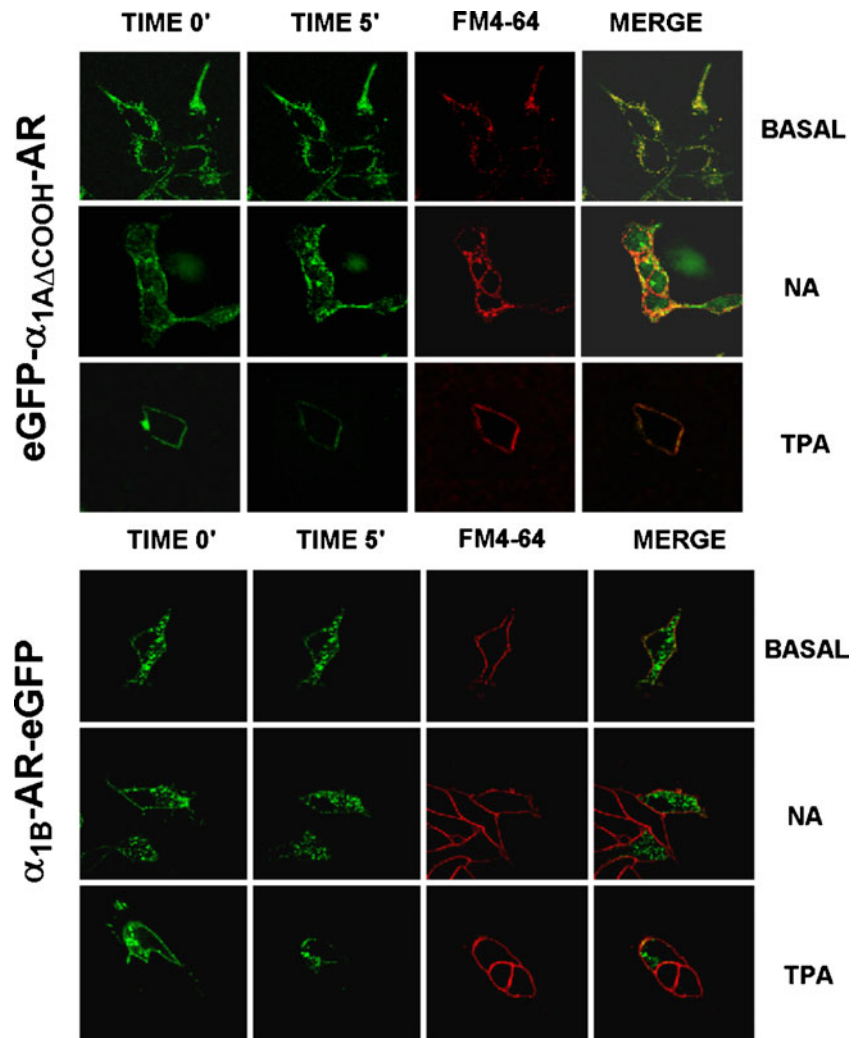
Hepatocytes from rats express a relatively high density of α_{1B} -ARs in their plasma membrane that, when activated, induce strong metabolic responses (increased glycogenolysis, gluconeogenesis, and urea synthesis) (Exton 1985; García-Sáinz et al. 1994). Surprisingly, guinea pig hepatocytes express a very small number of α_{1A} -ARs and when activated are also capable of inducing strong responses (García-Sáinz et al. 1992; García-Sáinz and Romero-Ávila 1993; González-Espinosa et al. 1999). These initial observations led us to suspect that α_{1A} -ARs possess more efficient coupling than α_{1B} -ARs. Studies employing transfected receptor subtypes supported this suspicion (Vázquez-Prado and García-Sáinz 1996), which was later confirmed with the human orthologs (Theroux et al. 1996). In the present work, we again observed that wild type α_{1A} -ARs coupled more efficiently than wild type α_{1B} -ARs.

Wild-type α_{1A} -ARs and carboxyl-truncated mutant receptors tagged at the amino terminus with the eGFP

induced clearly stronger responses than complete or carboxyl-truncated mutant receptors tagged at the carboxyl terminus with the eGFP, even when the latter receptors were expressed at bigger densities. Therefore, it seems likely that the fluorescent protein when fused to the receptor carboxyl tail limited the ability of these ARs to couple efficiently to signaling devices, i.e., it might have reduced their “efficacy.”

The marked functional sensitivity of hamster α_{1B} -ARs to protein kinase C activation was paralleled by a very strong phosphorylation under basal, noradrenaline-stimulated and TPA-stimulated conditions. Similarly, the weak functional TPA-sensitivity of bovine α_{1A} -ARs was paralleled by a weak, and difficult to detect phosphorylation. Exchange of the carboxyl tails produced the expected result in phosphorylation of the chimeric receptors, in agreement with previous results (Vázquez-Prado et al. 2000); i.e., α_{1AB} -AR chimeras carrying the α_{1B} tail were strongly phosphorylated and to an even greater extent by the action of TPA (5-fold) rather than by that of noradrenaline (3- to 4-fold; as

Fig. 8 Confocal images of HEK 293 cells expressing carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs fused at the amino terminus with enhanced GFP and complete α_{1B} -ARs fused at the carboxyl terminus with enhanced GFP. *Upper panel* α_{1A} -ARs. *Lower panel* α_{1B} -ARs. Cells were treated for 5 min with vehicle (BASAL), 10 μ M noradrenaline (NA) or 1 μ M TPA; at the end of incubation FM4-64 (membrane marker, red) was added and fluorescence recorded. *Right column* merge images are presented, colocalization is evidenced in yellow



observed for wild-type α_{1B} -ARs; 5- and 3-fold, respectively) whereas α_{1BA} -AR chimeras carrying the α_{1A} tail, were phosphorylated to a much lesser extent and the effects of TPA and noradrenaline were smaller (2-fold, for both of them).

At this point, the data hinted at the possibility that carboxyl tails could act as “transplantable elements” that modulate receptor sensitivity to protein kinase C. However, functional data with the chimeric and carboxyl terminus-truncated receptors failed to confirm this suspicion. On the one hand, chimeric α_{1BA} -ARs remained fairly sensitive to the action of protein kinase C activation as reflected by a very clear decrease in maximal response (intracellular calcium concentration). This result was puzzling because the major α_{1B} -AR phosphorylation sites were absent due to the removal of the carboxyl terminus (Lattion et al. 1994; Diviani et al. 1997) and desensitization of the α_{1A} subtype appears to be primarily independent of its carboxyl tail (Price et al. 2002) (and present data). Several, not mutually exclusive, possibilities might explain these results. Firstly,

activation of protein kinase C not only induces phosphorylation of receptors but also of other proteins in signaling pathways. Thus, it is possible that action(s) at site(s) other than the adrenoceptors might participate in the functional desensitization. However, the relatively small effect of TPA on wild type α_{1A} -AR-mediated action argues against this being a major factor; but it cannot be discarded. There is also evidence of functional desensitization in the absence of receptor phosphorylation for some G protein-coupled receptors (Ferguson 2007). The possibility that potential phosphorylation sites in the α_{1A} carboxyl tail or in the intracellular α_{1B} receptor domains of the α_{1BA} chimera might play a role in desensitization cannot be discarded either.

Very high affinity for tamsulosin was observed both in the wild-type receptor (as anticipated (García-Sáinz et al. 1995)) and in the carboxyl terminus-truncated mutant. However, the α_{1AB} chimera exhibited lower affinity. It is possible that fusion of the carboxyl tail of α_{1B} -ARs could alter the conformation of the receptor and that such a

change, without affecting the ability of noradrenaline to activate the receptor, could have altered its affinity for the selective antagonist.

Differences in α_{1A} - and α_{1B} -AR internalization have been reported (Chalothorn et al. 2002; Stanasila et al. 2008). Recent evidence indicates that α_{1A} -ARs lack of significant endocytosis due to poor interaction with β -arrestins and with the AP50 subunit of the AP2 clathrin adaptor complex (Stanasila et al. 2008). However, very interesting work published recently showed that truncation of the carboxyl tail of a prostaglandin receptor (CRTH2) enhanced constitutive and agonist-mediated internalization (Schroder et al. 2009). Therefore, the possibility that the desensitization observed in α_{1A} -AR carboxyl-truncated mutants could be related to internalization was considered. However, we were unable to detect any clear receptor internalization of α_{1A} -ARs after 5 min incubation with noradrenaline or TPA; nevertheless, under similar conditions internalization of α_{1B} -ARs was clearly detected. These data rule out the possibility that internalization could explain the rapid desensitization observed.

It is clear that there are marked variations in signaling and regulation among α_1 -AR subtypes. These divergences have been mainly evidenced in model cell systems in which the receptors were artificially overexpressed and it is difficult to define the physiological implications of these findings for native organs or tissues. Despite this important limitation, information is being acquired on the structural domains that participate in function and regulation. Further work will be required to define the sites that are phosphorylated in wild-type and carboxyl terminus-truncated α_{1A} -ARs and their role(s) in receptor function, cellular location and degradation.

Acknowledgments We thank Dra. S. Eréndida Avendaño-Vázquez for her help and advice, and, Dr. O. Araceli Patrón-Soberano and Gabriel Orozco-Oyuela for their technical support with the confocal microscopy images. The authors are also grateful to Aurey Galván and Manuel Ortíz for technical services. This work was supported by Grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (79908) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN212609). Alejandro Cabrera-Wrooman was awarded a fellowship from CONACyT (195660) for his PhD studies in the Program of Biochemical Sciences at Universidad Nacional Autónoma de México. The authors declare that they have no conflict of interest and thank Ms. M. Brunner, MA, for style corrections.

References

- Avendaño-Vázquez SE, García-Caballero A, García-Sáinz JA (2005) Phosphorylation and desensitization of the lysophosphatidic acid receptor LPA1. *Biochem J* 385:677–684
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* 333:370–373
- Budd DC, Willars GB, McDonald JE, Tobin AB (2001) Phosphorylation of the Gq/11-coupled m3-muscarinic receptor is involved in receptor activation of the ERK-1/2 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 276:4581–4587
- Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, García-Cazarin ML, Tsujimoto G, Piascik MT (2002) Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* 61:1008–1016
- Delhay M, Gravot A, Ayinde D, Niedergang F, Alizon M, Brelot A (2007) Identification of a postendocytic sorting sequence in CCR5. *Mol Pharmacol* 72:1497–1507
- Diviani D, Lattion AL, Cotecchia S (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 272:28712–28719
- Drake MT, Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res* 99:570–582
- Exton JH (1985) Mechanisms involved in alpha-adrenergic phenomena. *Am J Physiol* 248:E633–E647
- Ferguson SS (2007) Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci* 28:173–179
- Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1996) Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 271:13796–13803
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT (1993) Characterization of the alpha 1A-adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using 5-[3 H]methylurapidil. *Mol Pharmacol* 44:589–594
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila T, Olivares-Reyes JA, Macías-Silva M (1992) Guinea pig hepatocyte alpha 1A-adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur J Pharmacol* 227:239–245
- García-Sáinz JA, Casas-González P, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C (1994) Characterization of the hepatic alpha 1B-adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci* 54:1995–2003
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Villalobos-Molina R, Minneman KP (1995) Alpha 1-adrenoceptor subtype selectivity of tamsulosin: studies using livers from different species. *Eur J Pharmacol* 289:1–7
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Villalobos-Molina R (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res* 30:449–458
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J, Medina LC (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol* 389:1–12
- García-Sáinz JA, Vázquez-Cuevas FG, Romero-Ávila MT (2001) Phosphorylation and desensitization of alpha 1D-adrenergic receptors. *Biochem J* 353:603–610
- García-Sáinz JA, Rodríguez-Pérez CE, Romero-Ávila MT (2004) Human alpha-1D adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Biochem Pharmacol* 67:1853–1858
- González-Espinosa C, González-Espinosa D, Romero-Ávila MT, García-Sáinz JA (1999) Inverse alpha(1A) and alpha(1D) adrenoceptor mRNA expression during isolation of hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 384:231–237
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
- Hieble JP, Bylund DB, Clarke DE, Eikenburg DC, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Ruffolo RR Jr (1995) International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. *Pharmacol Rev* 47:267–270
- Hoffman BB, Lefkowitz RJ (1996) Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptors. In: Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Gilman AG (eds) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw Hill, New York, pp 199–248

- Labasque M, Reiter E, Becamel C, Bockaert J, Marin P (2008) Physical interaction of calmodulin with the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol Biol Cell* 19:4640–4650
- Lattion AL, Diviani D, Cotecchia S (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269:22887–22893
- Leeb-Lundberg LM, Cotecchia S, Lomasney JW, DeBernardis JF, Lefkowitz RJ, Caron MG (1985) Phorbol esters promote alpha 1-adrenergic receptor phosphorylation and receptor uncoupling from inositol phospholipid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5651–5655
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25:413–422
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115:455–465
- Molina-Muñoz T, Romero-Ávila MT, Avedaño-Vázquez SE, García-Sáinz JA (2008) Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha(1B)-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I. *Eur J Pharmacol* 578:1–10
- Pankevych H, Korkhov V, Freissmuth M, Nanoff C (2003) Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling. *J Biol Chem* 278:30283–30293
- Piascik MT, Perez DM (2001) Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther* 298:403–410
- Price RR, Morris DP, Biswas G, Smith MP, Schwinn DA (2002) Acute agonist-mediated desensitization of the human alpha 1a-adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: implications for regulation of alpha 1aAR splice variants. *J Biol Chem* 277:9570–9579
- Rodríguez-Pérez CE, Romero-Ávila MT, Reyes-Cruz G, García-Sáinz JA (2009) Signaling properties of human alpha(1D)-adrenoceptors lacking the carboxyl terminus: intrinsic activity, agonist-mediated activation, and desensitization. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 380:99–107
- Schroder R, Merten N, Mathiesen JM, Martini L, Kruljac-Letunic A, Krop F, Blaukat A, Fang Y, Tran E, Ulven T, Drewke C, Whistler J, Pardo L, Gomez J, Kostenis E (2009) The C-terminal tail of CRTH2 is a key molecular determinant that constrains Galphai and downstream signaling cascade activation. *J Biol Chem* 284:1324–1336
- Seibold A, Williams B, Huang ZF, Friedman J, Moore RH, Knoll BJ, Clark RB (2000) Localization of the sites mediating desensitization of the beta(2)-adrenergic receptor by the GRK pathway. *Mol Pharmacol* 58:1162–1173
- Stanasila L, Abuin L, Dey J, Cotecchia S (2008) Different internalization properties of the alpha1a- and alpha1b-adrenergic receptor subtypes: the potential role of receptor interaction with beta-arrestins and AP50. *Mol Pharmacol* 74:562–573
- Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S, Tsujimoto G (2003) Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab* 14:107–113
- Theroux TL, Esbenshade TA, Peavy RD, Minneman KP (1996) Coupling efficiencies of human alpha 1-adrenergic receptor subtypes: titration of receptor density and responsiveness with inducible and repressible expression vectors. *Mol Pharmacol* 50:1376–1387
- Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ, Luttrell LM (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem* 278:6258–6267
- Torrecilla I, Spragg EJ, Poulin B, McWilliams PJ, Mistry SC, Blaukat A, Tobin AB (2007) Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2. *J Cell Biol* 177:127–137
- Trester-Zedlitz M, Burlingame A, Kobilka B, von Zastrow M (2005) Mass spectrometric analysis of agonist effects on posttranslational modifications of the beta-2 adrenoceptor in mammalian cells. *Biochemistry* 44:6133–6143
- Vázquez-Prado J, García-Sáinz JA (1996) Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol* 50:17–22
- Vázquez-Prado J, Medina LC, García-Sáinz JA (1997) Activation of endothelin ETA receptors induces phosphorylation of alpha1b-adrenoceptors in Rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 272:27330–27337
- Vázquez-Prado J, Medina LC, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C, García-Sáinz JA (2000) Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem* 275:6553–6559
- Zhong H, Minneman KP (1999) Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 375:261–276

8. REFERENCIAS

- Abel JJ and Crawford AC (1897) On the blood-pressure raising constituent of the suprarenal capsule. *Bull Johns Hopkins Hosp.* **8**:151.
- Abel J and Crawford A (1897) On the blood-presure raising constituent of the suprarenal capsule. *Bull Johns Hopkins Hospital* **8**:151.
- Ahlquist RP (1948) A study of the adrenotropic receptors. *Am J Physiol.* **153**:586-600.
- Ahn S, Shenoy SK, Wei H and Lefkowitz RJ (2004) Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem.* **279**:35518-25. Epub 2004 Jun 17.
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature.* **333**:370-3.
- Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR, Jr. and Trendelenburg U (1994) International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* **46**:121-36.
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL and Kozasa T (1999) Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem.* **274**:34483-92.
- Casas-González P and García-Sáinz JA (2006) Role of epidermal growth factor receptor transactivation in alpha1B-adrenoceptor phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* **542**:31-6. Epub 2006 May 27.
- Casas-González P, Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (2000) Lysophosphatidic acid modulates alpha(1b)-adrenoceptor phosphorylation and function: roles of Gi and phosphoinositide 3-kinase. *Mol Pharmacol.* **57**:1027-33.
- Clapham DE and Neer EJ (1997) G protein beta gamma subunits. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**:167-203.
- Cotecchia S, Schwinn DA, Randall RR, Lefkowitz RJ, Caron MG and Kobilka BK (1988) Molecular cloning and expression of the cDNA for the hamster alpha 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**:7159-63.
- Chalothorn D, McCune DF, Edelmann SE, Garcia-Cazarin ML, Tsujimoto G and Piascik MT (2002) Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol.* **61**:1008-16.
- Chen Q, Takahashi S, Zhong S, Hosoda C, Zheng HY, Ogushi T, Fujimura T, Ohta N, Tanoue A, Tsujimoto G and Kitamura T (2005) Function of the lower urinary tract in mice lacking alpha1d-adrenoceptor. *J Urol.* **174**:370-4.
- Cho D, Zheng M, Min C, Ma L, Kurose H, Park JH and Kim KM (2010) Agonist-induced endocytosis and receptor phosphorylation mediate resensitization of dopamine D(2) receptors. *Mol* **24**:574-86. Epub 2010 Feb 16.
- Dang VC, Napier IA and Christie MJ (2009) Two distinct mechanisms mediate acute mu-opioid receptor desensitization in native neurons. *J Neurosci.* **29**:3322-7.
- Delhaye M, Gravot A, Ayinde D, Niedergang F, Alizon M and Brelot A (2007) Identification of a postendocytic sorting sequence in CCR5. *Mol Pharmacol.* **72**:1497-507. Epub 2007 Sep 12.

- Diviani D, Lattion AL and Cotecchia S (1997) Characterization of the phosphorylation sites involved in G protein-coupled receptor kinase- and protein kinase C-mediated desensitization of the alpha1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **272**:28712-9.
- Docherty JR (2009) Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor. *Cell Mol Life Sci* **67**:405-17.
- Drake MT, Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2006) Trafficking of G protein-coupled receptors. *Circ Res.* **99**:570-82.
- Ferguson SS (2007) Phosphorylation-independent attenuation of GPCR signalling. *Trends Pharmacol Sci.* **28**:173-9. Epub 2007 Mar 9.
- Ferguson SS, Downey WE, 3rd, Colapietro AM, Barak LS, Menard L and Caron MG (1996) Role of beta-arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization. *Science.* **271**:363-6.
- Ferguson SS, Zhang J, Barak LS and Caron MG (1998) Role of beta-arrestins in the intracellular trafficking of G-protein-coupled receptors. *Adv Pharmacol* **42**:420-4.
- Fletcher JE, Lindorfer MA, DeFilippo JM, Yasuda H, Guilford M and Garrison JC (1998) The G protein beta5 subunit interacts selectively with the Gq alpha subunit. *J Biol Chem.* **273**:636-44.
- Fredericks ZL, Pitcher JA and Lefkowitz RJ (1996) Identification of the G protein-coupled receptor kinase phosphorylation sites in the human beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **271**:13796-803.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG and Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol.* **63**:1256-72.
- Freedman NJ, Ament AS, Oppermann M, Stoffel RH, Exum ST and Lefkowitz RJ (1997) Phosphorylation and desensitization of human endothelin A and B receptors. Evidence for G protein-coupled receptor kinase specificity. *J Biol Chem.* **272**:17734-43.
- García-Sáinz JA (1995) Adrenaline and its receptors: one hundred years of research. *Arch Med Res.* **26**:205-12.
- García-Sáinz JA, Casas-González P, Romero-Ávila MT and González-Espinosa C (1994) Characterization of the hepatic alpha 1B-adrenoceptors of rats, mice and hamsters. *Life Sci* **54**:1995-2003.
- García-Sáinz JA and Romero-Ávila MT (1993) Characterization of the alpha 1A-adrenoceptors of guinea pig liver membranes: studies using 5-[3H]methylurapidil. *Mol Pharmacol.* **44**:589-94.
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila MT, Molina-Munoz T and Medina Ldel C (2004) Insulin induces alpha1B-adrenergic receptor phosphorylation and desensitization. *Life Sci.* **75**:1937-47.
- García-Sáinz JA, Romero-Ávila T, Olivares-Reyes JA and Macías-Silva M (1992) Guinea pig hepatocyte alpha 1A-adrenoceptors: characterization, signal transduction and regulation. *Eur J Pharmacol.* **227**:239-45.
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J and del Carmen Medina L (2000) Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. *Eur J Pharmacol.* **389**:1-12.
- García-Sáinz JA, Vázquez-Prado J and Villalobos-Molina R (1999) Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in health and disease. *Arch Med Res.* **30**:449-58.
- Gehret AU and Hinkle PM (2009) Importance of regions outside the cytoplasmic tail of G-protein-coupled receptors for phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem* **428**:235-45.
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**:615-49.

- Gonzalez-Espinosa C, Gonzalez-Espinosa D, Romero-Avila MT and Garcia-Sainz JA (1999) Inverse alpha(1A) and alpha(1D) adrenoceptor mRNA expression during isolation of hepatocytes. *Eur J Pharmacol.* **384**:231-7.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* **260**:3440-50.
- Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M and Margolskee RF (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP₃ responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci.* **2**:1055-62.
- Kobilka BK (2007) G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta.* **1768**:794-807. Epub 2006 Nov 15.
- Krupnick JG, Santini F, Gagnon AW, Keen JH and Benovic JL (1997) Modulation of the arrestin-clathrin interaction in cells. Characterization of beta-arrestin dominant-negative mutants. *J Biol Chem.* **272**:32507-12.
- Labasque M, Reiter E, Becamel C, Bockaert J and Marin P (2008) Physical interaction of calmodulin with the 5-hydroxytryptamine_{2C} receptor C-terminus is essential for G protein-independent, arrestin-dependent receptor signaling. *Mol Biol Cell.* **19**:4640-50. Epub 2008 Sep 3.
- Langley JN (1905) On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol.* **33**:374-413.
- Lattion AL, Diviani D and Cotecchia S (1994) Truncation of the receptor carboxyl terminus impairs agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the alpha 1B-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **269**:22887-93.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **25**:413-22.
- Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ and Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature.* **325**:321-6.
- Lohse MJ, Lefkowitz RJ, Caron MG and Benovic JL (1989) Inhibition of beta-adrenergic receptor kinase prevents rapid homologous desensitization of beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:3011-5.
- Lomasney JW, Cotecchia S, Lorenz W, Leung WY, Schwinn DA, Yang-Feng TL, Brownstein M, Lefkowitz RJ and Caron MG (1991) Molecular cloning and expression of the cDNA for the alpha 1A-adrenergic receptor. The gene for which is located on human chromosome 5. *J Biol Chem.* **266**:6365-9.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**:265-75.
- Luttrell LM, Ferguson SS, Daaka Y, Miller WE, Maudsley S, Della Rocca GJ, Lin F, Kawakatsu H, Owada K, Luttrell DK, Caron MG and Lefkowitz RJ (1999) Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science.* **283**:655-61.
- Luttrell LM and Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci.* **115**:455-65.
- Maier U, Babich A, Macrez N, Leopoldt D, Gierschik P, Illenberger D and Nurnberg B (2000) Gbeta 5gamma 2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J Biol Chem.* **275**:13746-54.
- Maier U, Babich A and Nurnberg B (1999) Roles of non-catalytic subunits in gbetagamma-induced activation of class I phosphoinositide 3-kinase isoforms beta and gamma. *J Biol Chem.* **274**:29311-7.

- McCudden CR, Hains MD, Kimple RJ, Siderovski DP and Willard FS (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci.* **62**:551-77.
- McDonald PH and Lefkowitz RJ (2001) Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal.* **13**:683-9.
- Mellor H and Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* **332**:281-92.
- Minneman KP and Esbenshade TA (1994) Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **34**:117-33.
- Molina-Muñoz T, Romero-Ávila MT, Avendano-Vázquez SE and García-Sáinz JA (2008) Phosphorylation, desensitization and internalization of human alpha1B-adrenoceptors induced by insulin-like growth factor-I. *Eur J Pharmacol.* **578**:1-10. Epub 2007 Sep 19.
- Olivares-Reyes JA, Smith RD, Hunyady L, Shah BH and Catt KJ (2001) Agonist-induced signaling, desensitization, and internalization of a phosphorylation-deficient AT1A angiotensin receptor. *J Biol Chem.* **276**:37761-8. Epub 2001 Aug 8.
- Oliver G and Schafer EA (1895) The Physiological Effects of Extracts of the Suprarenal Capsules. *J Physiol.* **18**:230-76.
- Pankevych H, Korkhov V, Freissmuth M and Nanoff C (2003) Truncation of the A1 adenosine receptor reveals distinct roles of the membrane-proximal carboxyl terminus in receptor folding and G protein coupling. *J Biol Chem.* **278**:30283-93. Epub 2003 May 22.
- Perez DM, Hwa J, Gaivin R, Mathur M, Brown F and Graham RM (1996) Constitutive activation of a single effector pathway: evidence for multiple activation states of a G protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol.* **49**:112-22.
- Pérez DM, Piascik MT and Graham RM (1991) Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. *Mol Pharmacol.* **40**:876-83.
- Piascik MT, Butler BT and Pruitt TA (1990) The role of alpha 1-adrenoceptor subtypes in the regulation of arterial blood pressure. *Eur J Pharmacol.* **180**:381-6.
- Piascik MT and Perez DM (2001) Alpha1-adrenergic receptors: new insights and directions. *J Pharmacol Exp Ther.* **298**:403-10.
- Pierce KL, Premont RT and Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**:639-50.
- Premont RT, Inglese J and Lefkowitz RJ (1995) Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *Faseb J.* **9**:175-82.
- Price RR, Morris DP, Biswas G, Smith MP and Schwinn DA (2002) Acute agonist-mediated desensitization of the human alpha 1a-adrenergic receptor is primarily independent of carboxyl terminus regulation: implications for regulation of alpha 1aAR splice variants. *J Biol Chem.* **277**:9570-9. Epub 2002 Jan 7.
- Ray K, Kunsch C, Bonner LM and Robishaw JD (1995) Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J Biol Chem.* **270**:21765-71.
- Rodríguez-Pérez CE, Calvo-Ochoa E, Kalashnikova EV, Reyes-Cruz G, Romero-Ávila MT and García-Sáinz JA (2009) Receptor tyrosine kinases regulate alpha1D-adrenoceptor signaling properties: phosphorylation and desensitization. *Int J Biochem Cell Biol.* **41**:1276-83. Epub 2008 Nov 6.
- Romero-Ávila MT, Flores-Jasso CF and García-Sáinz JA (2002) alpha1B-Adrenergic receptor phosphorylation and desensitization induced by transforming growth factor-beta. *Biochem J.* **368**:581-7.
- Rosse C, Linch M, Kermorgant S, Cameron AJ, Boeckeler K and Parker PJ (2010) PKC and the control of localized signal dynamics. *Nat* **11**:103-12.

- Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B and De Blasi A (1997) G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *J Biol Chem.* **272**:10188-95.
- Sanbe A, Tanaka Y, Fujiwara Y, Miyauchi N, Mizutani R, Yamauchi J, Cotecchia S, Koike K, Tsujimoto G and Tanoue A (2009) Enhanced vascular contractility in alpha1-adrenergic receptor-deficient mice. *Life Sci.* **84**:713-8. Epub 2009 Feb 26.
- Schroder R, Merten N, Mathiesen JM, Martini L, Kruljac-Letunic A, Krop F, Blaukat A, Fang Y, Tran E, Ulven T, Drewke C, Whistler J, Pardo L, Gomeza J and Kostenis E (2009) The C-terminal tail of CRTH2 is a key molecular determinant that constrains Galphai and downstream signaling cascade activation. *J Biol Chem.* **284**:1324-36. Epub 2008 Nov 14.
- Schwinn DA, Lomasney JW, Lorenz W, Szklut PJ, Fremeau RT, Jr., Yang-Feng TL, Caron MG, Lefkowitz RJ and Cotecchia S (1990) Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel alpha 1-adrenergic receptor subtype. *J Biol Chem.* **265**:8183-9.
- Shenoy SK and Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem.* **278**:14498-506. Epub 2003 Feb 6.
- Stanasila L, Abuin L, Dey J and Cotecchia S (2008) Different internalization properties of the alpha1a- and alpha1b-adrenergic receptor subtypes: the potential role of receptor interaction with beta-arrestins and AP50. *Mol Pharmacol.* **74**:562-73. Epub 2008 Jun 3.
- Stephens L, Smrcka A, Cooke FT, Jackson TR, Sternweis PC and Hawkins PT (1994) A novel phosphoinositide 3 kinase activity in myeloid-derived cells is activated by G protein beta gamma subunits. *Cell.* **77**:83-93.
- Stephens LR, Eguinoa A, Erdjument-Bromage H, Lui M, Cooke F, Coadwell J, Smrcka AS, Thelen M, Cadwallader K, Tempst P and Hawkins PT (1997) The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell.* **89**:105-14.
- Takamine J (1902) The isolation of the active principle of the suprarenal gland. *J Physiol.* **27**:XXIX.
- Tanoue A, Koshimizu TA, Shibata K, Nasa Y, Takeo S and Tsujimoto G (2003) Insights into alpha1 adrenoceptor function in health and disease from transgenic animal studies. *Trends Endocrinol Metab.* **14**:107-13.
- Tohgo A, Choy EW, Gesty-Palmer D, Pierce KL, Laporte S, Oakley RH, Caron MG, Lefkowitz RJ and Luttrell LM (2003) The stability of the G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction determines the mechanism and functional consequence of ERK activation. *J Biol Chem.* **278**:6258-67. Epub 2002 Dec 6.
- Ulahannan TJ, Karpe F, Humphreys SM, Matthews DR and Frayn KN (2002) Effects of acute administration of doxazosin on fasting and postprandial haemodynamics and lipid metabolism in healthy subjects. *Horm Metab Res.* **34**:499-503.
- Usui H, Nishiyama M, Moroi K, Shibasaki T, Zhou J, Ishida J, Fukamizu A, Haga T, Sekiya S and Kimura S (2000) RGS domain in the amino-terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 inhibits Gq-mediated signaling. *Int J Mol Med.* **5**:335-40.
- Vázquez-Prado J, Cásas-González P and García-Sáinz JA (2003) G protein-coupled receptor cross-talk: pivotal roles of protein phosphorylation and protein-protein interactions. *Cell Signal.* **15**:549-57.
- Vázquez-Prado J and García-Sáinz JA (1996) Effect of phorbol myristate acetate on alpha 1-adrenergic action in cells expressing recombinant alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Mol Pharmacol.* **50**:17-22.
- Vázquez-Prado J, Medina LC, Romero-Ávila MT, González-Espinosa C and García-Sáinz JA (2000) Norepinephrine- and phorbol ester-induced phosphorylation of alpha(1a)-adrenergic receptors. Functional aspects. *J Biol Chem.* **275**:6553-9.

- Waugh DJ, Zhao MM, Zuscik MJ and Perez DM (2000) Novel aromatic residues in transmembrane domains IV and V involved in agonist binding at alpha(1a)-adrenergic receptors. *J Biol Chem.* **275**:11698-705.
- Wu D, Katz A, Lee CH and Simon MI (1992) Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem.* **267**:25798-802.
- Yang W and Xia SH (2006) Mechanisms of regulation and function of G-protein-coupled receptor kinases. *World J Gastroenterol.* **12**:7753-7.
- Yin D, Gavi S, Wang HY and Malbon CC (2004) Probing receptor structure/function with chimeric G-protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol.* **65**:1323-32.
- Yu X, Zhou F, Zhu M, Chen G and Yao X (2005) GPS:a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.* **1**:33.
- Zhang J, Barak LS, Winkler KE, Caron MG and Ferguson SS (1997) A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem.* **272**:27005-14.
- Zhong H and Minneman KP (1999) Alpha1-adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* **375**:261-76.

ABREVIATURAS

cAMP - Adenosin monofosfato cíclico

DAG - Diacilglicerol

GTP - Guanosin trifosfato

GDP - Guanosin difosfato

GPCR - receptores acoplados a proteínas G

GRK - Proteína cinasa de receptores acoplados a proteínas G

IP3 - Inositol 4,5 trifosfato

NA - noradrenalina

PLC - Proteína fosfolipasa C

PKC - Proteína cinasa C

PI3K - Fosfoinositido 3 cinasa

TPA - 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato